

**JULIO CESAR DE ARAUJO SANTOS**

**INTOXICAÇÃO POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS**

**PATOS/PB  
2006**

**JULIO CESAR DE ARAUJO SANTOS**

**INTOXICAÇÃO POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Ruminantes, da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos - PB, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária de Pequenos Ruminantes na área de Plantas Tóxicas.

Orientador: Prof. Dr. Franklin Riet-Correa Amaral

**Patos/PB  
Dezembro/2006**

**INTOXICAÇÃO POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS**

**JULIO CESAR DE ARAUJO SANTOS**

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA PELA BANCA  
EXAMINADORA:**

**Orientador:**

---

FRANKLIN RIET-CORREA

**Examinador:**

---

CLAUDIO SEVERO LOMBARDO DE BARROS

**Examinador:**

---

SARA VILAR DANTAS SIMÕES

---

**Patos/PB  
Dezembro/2006**

A minha família, a minha  
noiva, a Franklin Riet-  
Correa e aos meus  
verdadeiros amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Santo Antônio pela força transmitida a mim e que com certeza me estimulou até o fim dessa jornada.

A toda a minha família pelo amor, carinho e confiança depositada em mim.

A minha noiva Lara pelo companheirismo, pela convivência e pelo carinho e a toda sua família pelo apoio que me deram.

Ao professor Franklin Riet-Correa pela oportunidade dada, pela confiança que depositou em mim e pela convivência.

Ao professor Antonio Flávio pelos conselhos, ensinamentos e pela convivência.

Aos colegas da patologia Juliana, Karla, Bruno, Professora Verônica, Dona Joana e o Professor Eldinê.

Aos colegas do mestrado Francisco Roserlandio, Fabiano, Iara, Elisângela, Othon, Alan, Cláudia, Leandro e Sóstenes.

Aos amigos Durval Moraes e Adriana Bonfim pelas dicas e pelo convívio.

Aos amigos Elisney, Charles, Adriano, Luciano, Aliomar Júnior, Jalaska, Damião, Vicente, Romeria, Antonieia e a todo o pessoal do Espetinho do Ranieri pelos bons momentos que passamos.

Ao amigo José Alan pela amizade e pela ajuda no experimento e no manejo com os animais.

Aos professores do CSTR, em especial aos professores Ana Célia, Jacob Silva, José Moraes, pela amizade, pelo apoio e pelos ensinamentos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE QUADROS

	Página
<b>Quadro 1.</b> Plantas que causam necrose hepática em ruminantes e eqüinos no Brasil.	12
<b>Quadro 2.</b> Plantas que causam fibrose hepática em ruminantes e eqüinos no asil.	13
<b>Quadro 3.</b> Plantas que causam fotossensibilização hepatógena em ruminantes e eqüinos no Brasil.	14

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Forma e período de administração de <i>T. cinerea</i> ao Ovino 3.	54
<b>Tabela 2.</b> Atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST) e Gama-glutamiltransferase (GGT), e valores de proteínas totais (PT) e albumina (ALB) nos Ovinos 3 e 4 intoxicados experimentalmente por <i>T. cinerea</i> e em dois animais utilizados como controle.	55

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Fig. 1.</b> <i>Tephrosia cinerea</i> . Município de Caicó, Rio Grande do Norte.	47
<b>Fig. 2.</b> <i>Tephrosia cinerea</i> . Folhas, vagens e flores. Município de Caicó, Rio Grande do Norte.	47
<b>Fig. 3.</b> Mapa da região Nordeste do Brasil com destaque para os Municípios dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte onde foram observados casos de intoxicação por <i>T. cinerea</i> em ovinos.	48
<b>Fig. 4.</b> Ovino intoxicado experimentalmente por <i>T. cinerea</i> com aumento de volume abdominal devido à severa ascite.	50
<b>Fig. 5.</b> Fígado. Ovino intoxicado experimentalmente por <i>T. cinerea</i> . A superfície do fígado está muito irregular e com pequenos nódulos.	51
<b>Fig. 6.</b> Fígado. Ovino intoxicado experimentalmente por <i>T. cinerea</i> . Fibrose, moderada proliferação de células epiteliais de ductos biliares e dilatação de vasos linfáticos e veias são observados no espaço porta. HE, x10.	52
<b>Fig. 7.</b> Fígado. Ovino intoxicado experimentalmente por <i>T. cinerea</i> . A cápsula de Glisson está espessada e o tecido fibroso estende-se para o interior do parênquima hepático. Há severa vacuolização e necrose de hepatócitos. HE, x20	53
<b>Fig. 8.</b> Microscopia eletrônica. Fígado. Ovino 4. Sinusóides (cabeça da seta) obstruídos pelo ingurgitamento de células endoteliais (asteriscos). Há hiperplasia de retículo endoplasmático liso (seta). Hepatócitos (H). Barra = 1 µm.	56



## SUMÁRIO

	PÁGINA
Dedicatória	
Agradecimentos	
Lista de quadros	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
<b>Capítulo I – Mecanismo de produção, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas para ruminantes e eqüinos no Brasil.</b>	<b>9</b>
<b>Abstract</b>	<b>10</b>
<b>Resumo</b>	<b>11</b>
<b>Introdução</b>	<b>11</b>
<b>Insuficiência hepática</b>	<b>15</b>
<b>Diagnóstico da insuficiência hepática em ruminantes e eqüinos.</b>	<b>17</b>
<b>Mecanismos de ação, sinais clínicos e patologia dos princípios ativos de plantas que causam insuficiência hepática.</b>	<b>21</b>
<b>Carboxiatractilosídeos (CAT)</b>	<b>21</b>
<b>Alcalóides pirrolizidínicos (AP)</b>	<b>24</b>
<b>Furanossesquiterpenos (FST)</b>	<b>28</b>
<b>Triterpenos</b>	<b>30</b>
<b>Saponinas esteroidais</b>	<b>32</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo II - Intoxicação por <i>Tephrosia cinerea</i> em ovinos (versão traduzida).</b>	<b>44</b>
<b>Resumo</b>	<b>46</b>
<b>Referências</b>	<b>58</b>
<b>Anexo. Trabalho original para publicação escrito em inglês: Intoxication by <i>Tephrosia cinerea</i> in sheep.</b>	<b>59</b>

**CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA**

**MECANISMO DE PRODUÇÃO, SINAIS CLÍNICOS E PATOLOGIA DAS  
DOENÇAS CAUSADAS POR PLANTAS HEPATOTÓXICAS PARA  
RUMINANTES E EQÜINOS NO BRASIL.**

**Trabalho a ser enviado para publicação à Pesquisa Veterinária Brasileira**

**Mecanismo de produção, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas para ruminantes e eqüinos no Brasil.**

Julio Cesar de Araújo Santos<sup>1</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>2</sup>, Sara Vilar Dantas Simões<sup>2</sup> & Claudio Severo Lombardo de Barros<sup>3</sup>.

**ABSTRACT.** - Santos J.C.A., Riet-Correa F., Simões S.V.D. & Barros C.S.L. 2007. [Mechanism of production, clinical signals and pathology of the illnesses caused for hepatotoxic plants for ruminants and equines in Brazil.] Mecanismo de produção, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas para ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*...Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, 58700-000 Patos, PB, Brazil. E-mail: franklin.riet@pesquisador.cnpq.br

Hepatotoxic plants in Brazil can be placed in three main groups: plants causing acute liver necrosis; plants causing liver fibrosis; and plants causing hepatogenous photosensibilization. For some of these plants the toxic principles have already had been identified. *Cestrum parqui* and *Xanthium cavanillesi* that cause acute liver necrosis contain carboxyatractylosides. *Senecio* spp., *Crotalaria* spp., and *Echium plantagineum*, that cause liver fibrosis contain pyrrolizidine alkaloids. Of these plants causing hepatogenous photosensibilization, *Myoporum* spp. contain furanosesquiterpenes, *Lantana* spp. contain triterpenes, and *Brachiaria* spp. and *Panicum* spp contain steroidal saponins. The clinical and pathologic features of the intoxications caused by those plant-contained substances are reviewed as are the general mechanisms of production the clinical signs and methods for diagnosis of hepatic failure.

**INDEX TERMS:** Hepatotoxic plants, liver failure, carboxyatractylosides, pyrrolizidine alkaloids, furanosesquiterpenes, triterpenes, steroidal saponins.

<sup>1</sup> Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Ruminantes, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, 58700-000, Patos, PB. Email: asjcesar@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, 58700-000, Patos, PB. Email: [franklin.riet@pesquisador.cnpq.br](mailto:franklin.riet@pesquisador.cnpq.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

**RESUMO:** No Brasil ocorrem diversas intoxicações por plantas hepatotóxicas em animais de produção. Em geral essas plantas podem ser divididas em três grandes grupos: plantas que causam necrose hepática aguda; plantas que causam fibrose hepática; e plantas que causam fotossensibilização. Em algumas dessas plantas os princípios tóxicos já foram identificados. Das plantas que causam necrose hepática aguda, os carboxiatractilosídeos estão presentes em *Cestrum parqui* e *Xanthium cavanillesi*. Os alcalóides pirrolizidínicos estão presentes nas plantas que causam fibrose hepática (*Senecio* spp., *Echium plantagineum*, *Heliotropum* spp. e *Crotalaria* spp.). Das plantas que causam fotossensibilização hepatógena são conhecidos os furanossesquiterpenos em *Myoporum* spp., triterpenos em *Lantana* spp., e saponinas esteroidais em *Brachiaria* spp. e *Panicum* spp. O quadro clínico patológico dessas intoxicações e o mecanismo geral da insuficiência hepática, incluindo meios de diagnósticos, são descritos neste artigo de revisão.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plantas hepatotóxicas, insuficiência hepática, carboxiatractilosídeos, alcalóides pirrolizidínicos, furanossesquiterpenos, triterpenos e saponinas esteroidais.

## INTRODUÇÃO

No Brasil ocorrem pelo menos 34 espécies de plantas hepatotóxicas distribuídas em 15 gêneros, que podem ser divididas em três grupos: plantas que causam necrose hepática aguda; plantas que causam fibrose hepática e plantas que causam fotossensibilização. Algumas dessas plantas têm princípio ativo conhecido, enquanto de outras não se conhecem as substâncias responsáveis pelo quadro clínico patológico (Quadros 1, 2 e 3). O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão dos mecanismos de ação das plantas hepatotóxicas em especial das que ocorrem no Brasil. Adicionalmente, para facilitar o reconhecimento dessas intoxicações pelos veterinários de campo, se inclui uma seção sobre sinais clínicos e patologia da insuficiência hepática.

**Quadro 1. Plantas que causam necrose hepática aguda em ruminantes e eqüinos no Brasil.**

Planta	Família	Nome vulgar	Princípio ativo	Espécies afetadas	Referências
<i>Cestrum parqui</i>	Solanaceae	Coerana	Carboxiatractilosídeos (CAT)	Bovinos	Riet-Correa et. al. 1986.
<i>Cestrum intermedium</i>	Solanaceae	Coreana branca, mata boi, piloteira preta.	Desconhecido	Bovinos	Gava et. al. 1996.
<i>Cestrum laevigatum</i>	Solanaceae	Dama da noite, coreana.	Desconhecido	Bovinos, caprinos e búfalos.	Dobereiner et. al. 1969, Peixoto et al. 2000.
<i>C. corymbosum</i> Var. <i>hisurtum</i>	Solanaceae	Não possui.	Desconhecido	Bovinos	Gava et. al. 1991
<i>Xanthium cavanillesii</i>	Asteraceae	Carrapicho	CAT	Bovinos e ovinos	Mendez et al. 1998, Friemeier et al. 1999.
<i>Vernonia mollissima</i>	Asteraceae	Vernonia	Desconhecido	Bovinos e ovinos	Dobereiner et. al. 1976, Tokarnia e Dobereiner 1982.
<i>Vernonia rubricaulis</i>	Asteraceae	Vernonia	Desconhecido	Bovinos	Tokarnia & Dobereiner 1982, Brum et al. 2002
<i>Sessea brasiliensis</i>	Solanaceae	Peroba d'água, canela de veado, Pau de osso, queluz.	Desconhecido	Bovinos	Canella et. al. 1968.
<i>Dodonea viscosa</i>	Sapindaceae	Vassoura-vermelha, vassoura de campo.	Desconhecido	Bovinos	Colodel et. al. 2003, Cattani et. al. 2004.
<i>Trema micrantha</i>	Ulmaceae	Não possui	Desconhecido	Caprinos e bovinos	Traverso et. al. 2002, Traverso et. al. 2003, Traverso et. al. 2004.

**Quadro 2. Plantas que causam fibrose hepática em ruminantes e eqüinos no Brasil.**

Planta	Família	Nome Vulgar	Princípio ativo	Espécies afetadas	Referências
<i>Crotalaria retusa</i>	Leguminosaeae-Fabaceae	Guizo de cascavel, chocalho, xique-xique.	Alcalóides Pirrolidizidínicos (AP)	Bovinos, equinos e ovinos.	Dantas et al. 1999, 2004, Nobre et al. 2004, 2005.
<i>C. juncea</i>	Leguminosaeae-Fabaceae	Idem <i>C. retusa</i>	AP	Eqüinos	Nobre et al. 1994
<i>Senecio brasiliensis</i> <i>S. selloi</i> <i>S. cisplatinus</i> <i>S. heterotrichus</i> <i>S. leptolobus</i> <i>S. oxyphyllus</i> <i>S. tweediei</i>	Asteraceae	<i>S. brasiliensis</i> : Maria-mole, flor-das-almas, tazneirinha	AP	Bovinos, ovinos e equinos	Barros et al. 1987, 1992, Gava e Barros 1997, Méndez et al. 1987, 1993, Ilha et al. 2001, Karan et al 2004.
<i>Echium plantagineum</i>	Borraginaceae	Flor roxa, língua de vaca	AP	Bovinos	Mendez et al. 1985.

**Quadro 3. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena em ruminantes e eqüinos no Brasil.**

Planta	Família	Nome vulgar	Princípio ativo	Espécies afetadas	Referências
<i>Brachiaria decumbens</i> <i>B. humidicola</i> <i>B. brizantha</i> <i>B. ruziziensis</i>	Poaceae	Capim brachiaria	Saponinas litogênicas	Bovinos, ovinos, caprinos, búfalos e eqüinos.	Lemos et. al. 1996 a,b,c; 1997, 1998, 2002; Driemeier et. al. 1998; Tokarnia et. al. 2000, Barbosa et. al. 2006. Rozza et al. 2004
<i>Panicum dichotomiflorum</i>	Poaceae	Capim do banhado	Saponinas litogênicas	Ovinos	Riet-Correa et al. 2006, dados não publicados.
<i>Lantana câmara*</i> <i>L. tiliaefolia</i> <i>L. glutinosa</i>	Verbenaceae	Câmara, cambará e chumbinho.	Lantadene A Lantadene B	Bovinos e ovinos	Tokarnia et al. 1984, Riet-Correa et al. 1984
<i>Myoporum laetum</i>	Myoporaceae	Transparente, cerca viva.	Furanossequiterpenos	Ovinos e bovinos	Raposo et. al. 1998, 2003.
<i>Stryphnodedron coriaceum</i>	Leguminosaeae mimosideae	Barbatimão, Barbatimão do nordeste	Desconhecido	Bovinos	Tokarnia et al. 1991.
<i>S. obovatum</i>	Leguminosaeae mimosideae	Barbatimão	Desconhecido	Bovinos	Tokarnia et al. 1998.
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Leguminosaeae mimosideae	Tamboril do campo, orelha de onça	Desconhecido	Bovinos	Deutsch et al. 1965.
<i>E. contortisiliquum</i>	Leguminosaeae mimosideae	Orelha de macaco, timbaúva, tamboril, timbó	Desconhecido	Bovinos	Grecco et. al. 1998, Tokarnia et al. 1960
<i>E. timbouva</i>	Leguminosaeae mimosideae	Orelha de macaco, timbaúva, tamboril, timbó.	Desconhecido	Bovinos	Lemos et al. 1998.

\* Também pode causar fibrose.

## INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA

O fígado é o responsável direto pelos processos de síntese, excreção e catabolismo. O metabolismo hepático parece quase infinito quanto a sua variedade e complexidade (KELLY 1993). As substâncias absorvidas pelo intestino têm seu primeiro contato no organismo com o fígado, que numa posição estratégica, impede a exposição do restante do corpo à ação de toxinas. Os sistemas enzimáticos de detoxificação hepática, como a citocromo P-450, atuam de forma rápida e têm ampla especificidade, dando ao animal a capacidade de suportar uma grande variedade de desafios causados por toxinas naturais e sintéticas (CHEEKE 1994).

A insuficiência hepática ocorre somente quando há comprometimento de 75% do parênquima hepático, o que ocorre principalmente com as lesões difusas, como as intoxicações, e não ocorre em lesões focais ou multifocais, como tumores e abscessos. As lesões focais produzem seus efeitos pela formação de toxinas na lesão ou por pressão em outros órgãos, como o sistema biliar (RADOSTITS et al. 2002).

Os principais sinais clínicos causados pela insuficiência hepática são: icterícia, edemas, hemorragias, fotossensibilização e encefalopatia hepática.

**Icterícia.** A colestase é uma falha hepática na excreção e secreção de pigmentos, ácidos biliares e sais biliares. Este fenômeno produz uma síndrome clínica conhecida como icterícia que consiste no amarelamento dos tecidos pela presença dos pigmentos biliares. A intensidade dessa coloração depende de dois fatores: da intensidade (quantidade de pigmento biliar que está sendo retido) e a duração da colestase. Quando a colestase dura vários dias, os tecidos equilibram seus níveis de pigmentos biliares com os do plasma e a icterícia é severa (KELLY 1993, KELLY 2002).

**Edema.** Os edemas hipoproteinêmicos podem também ser visualizados na insuficiência hepática. Isto se deve a uma falha na síntese de albumina e outras proteínas do plasma por parte do fígado, que resulta na ocorrência de edema no tecido subcutâneo localizado nas regiões ventrais do animal, edema do mesentério e da parede de algumas vísceras, ascite, hidrotórax e hidropericárdio. O edema pode também ser causado por outros fatores como alterações de permeabilidade vascular, falha circulatória e hipoproteinemia por insuficiência renal, parasitoses ou má-nutrição, que o clínico deverá levar em consideração no diagnóstico diferencial de insuficiência hepática (KELLY 1993, KELLY 2002). Ascite pode ser causada por hipertensão portal secundária a fibrose. A passagem de sangue através da circulação portal diretamente



para a veia cava é dependente da integridade do leito vascular hepático, e a sua obstrução resulta em bloqueio da passagem de sangue pelo sistema portal, conduzindo a hipertensão portal e ascite (RADOSTITS et al. 2002).

**Hemorragias.** A lesão repentina e severa do fígado pode causar hemorragias. Durante uma fase de necrose, uma grande proporção de sangue do animal é posta em contato com uma grande proporção de tecido lesado e endotélio vascular. Isto faz disparar a cascata da coagulação que por sua vez iniciará também o fenômeno de fibrinólise compensatória. O resultado, se esta seqüência de eventos for rápida, é o consumo dos fatores de coagulação. A depleção nesse caso é mais profunda já que esses fatores em sua maioria são sintetizados pelo fígado. Os animais com esse quadro clínico patológico terminam por apresentar diáteses hemorrágicas observadas, principalmente, na necropsia sob a forma de petéquias e equimoses (KELLY 1993, KELLY 2002).

**Fotossensibilização.** A falta de eliminação de filioeritrina pelo sangue portal em animais com insuficiência hepática tem especial significado em herbívoros. Este pigmento é produzido no trato digestivo pela degradação da clorofila e excretado na bile. Quando há obstrução biliar a filioeritrina não é eliminada e se acumula nos tecidos. Em áreas de pele despigmentadas e expostas à luz solar essa substância, que é fotodinâmica, reage com a luz ultravioleta causando dermatite, com dano vascular e epidérmico, condição conhecida como fotossensibilização secundária ou hepatógena. Como a excreção de filioeritrina segue os mesmos passos da eliminação dos pigmentos biliares é comum, porém não obrigatório, observar-se icterícia associada à fotossensibilização secundária. Uma elevação dos valores de bilirrubina e/ou ácidos biliares é observada na fotossensibilização hepatógena (KELLY 1993, KELLY 2002).

**Encefalopatia hepática.** A sintomatologia nervosa é causada pelos efeitos tóxicos provocados pelo acúmulo de diversas substâncias tóxicas na corrente sangüínea, tais como a amônia, ácidos graxos de cadeias curtas e mercaptanos no encéfalo e no líquor, além de alterações nas concentrações de neurotransmissores. Entretanto, a amônia é considerada como a substância mais importante na patogênese da encefalopatia hepática (KELLERMAN et al. 1988, RADOSTITS et al. 2002). A elevada quantidade de amônia no sangue causa um aumento da passagem da mesma para o cérebro, onde reage com o ácido  $\alpha$ -cetoglutárico para formar a glutamina. A depleção do  $\alpha$ -cetoglutarato, que é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, prejudica a formação do ATP, conduzindo a uma diminuição do ATP para conduzir o metabolismo cerebral (CHEEKE 1998). Normalmente, substâncias tóxicas são eliminadas através do sangue portal em uma

única passagem pelo fígado normal, evitando a sua chegada ao cérebro onde podem atuar como neurotransmissores falsos e causar vários sinais clínicos neurológicos (KELLY 2002). A base morfológica desses sinais neurológicos é uma degeneração esponjosa no sistema nervoso central causada pela hiperamonemia. Estão aumentados os níveis de amônia no sangue e de glutamina no líquido cefalorraquidiano (HOOPER et al. 1974, HOOPER et al. 1975).

A degeneração esponjosa (*status spongiosus*), que ocorre por um edema intramielínico, é mais pronunciada na substância branca do mesencéfalo, base do encéfalo, nos pedúnculos cerebelares e na junção entre substância branca e cinzenta (ILHA et al. 2001, MENDEZ et al. 1987, BARROS et al. 1987). É provável que existam diferenças entre as espécies na patogênese e manifestação da encefalopatia hepática. A mielinopatia esponjiforme que ocorre na maioria das espécies aparentemente não ocorre no homem e no cavalo. Ao invés disso, nestas espécies, observamos um aumento no tamanho dos astrócitos, que neste caso são denominados de astrócitos Alzheimer tipo II (KELLY 1993).

#### **Diagnóstico da insuficiência hepática em ruminantes e eqüinos**

Os sinais clínicos de insuficiência hepática são variados e isso pode representar uma dificuldade na interpretação e confirmação do diagnóstico de insuficiência hepática por parte dos veterinários de campo. Portanto, para o diagnóstico é necessária a utilização de métodos complementares como a biópsia e avaliação das enzimas hepáticas.

A biópsia hepática é usada extensamente como um método de diagnóstico de lesões hepáticas difusas em trabalhos experimentais. Ela requer habilidade e conhecimento anatômico. A principal deficiência do método reside na obtenção de amostras pequenas, e, a menos que a alteração hepática seja difusa, a amostra pode não ser representativa. O método pode ser repetido várias vezes no mesmo animal sem causar transtornos. As amostras devem medir no mínimo 7 mm, obtendo-se tecido suficiente para um exame histológico adequado ou mesmo uma análise química (Cu, por exemplo) (KELLY 2002). O maior perigo é a ocorrência de uma falha, abordando o hilo e lesando vasos sanguíneos de grande calibre ou ductos biliares. Se o fígado se apresentar encolhido ou o acesso for muito caudal, nenhuma amostra será colhida. Se a

biópsia for acompanhada por ultra-sonografia diminuem-se os riscos e aumenta a eficiência (RADOSTITS et al. 2002).

As provas bioquímicas realizadas no soro sanguíneo dos animais domésticos apresentam resultados que constituem excelente subsídio ao diagnóstico clínico das enfermidades do fígado; esses exames são reunidos como baterias de provas referidas como avaliadoras da função hepática (SOUZA et al. 2004). Os resultados e a interpretação de tais testes dependem da natureza da lesão, duração e intensidade da doença, além das variações entre as espécies (RADOSTITS et al. 2002).

Para avaliar a função hepática são indicados vários constituintes, porém todos apresentam restrições, pois existe interdependência do fígado com outros órgãos (MORAIS et al. 2000). Segundo Kramer (1989), os testes de função hepática incluem os que medem o transporte (secreção, conjugação e excreção) tais como bilirrubina (BIL) e ácidos biliares, a atividade enzimática para detectar necrose, colestase e carcinomas, e os bioquímicos que avaliam a capacidade hepática de metabolização de nutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas).

Há várias enzimas intracelulares que se encontram em grandes concentrações dentro dos hepatócitos vivos. Quando seus níveis estão aumentados no sangue, é possível que esteja ocorrendo uma doença hepática ativa. As enzimas específicas do fígado são diferentes entre as espécies (KELLY 2002).

Em bovinos adultos, gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), sorbitol-desidrogenase (SDH) e aspartato-aminotranferase (AST) são as mais úteis na identificação dos animais com doença hepática crônica. A SDH tem meia-vida curta no soro e pode não estar aumentada em bovinos com doença hepática crônica. Nos estágios iniciais de doença hepática nos bovinos, a SDH é o teste mais eficiente e sensível. Nos estágios tardios, quando os testes de excreção biliar são mais aplicáveis, a determinação da bilirrubina sérica e os testes da bromossulfaleína são indicados. Em bezerros com menos de seis meses de vida, nenhum dos testes comuns para avaliar a lesão ou função hepática em bovinos adultos, é indicada para a detecção de doença hepática. Recomenda-se nestes casos a biópsia hepática (RADOSTITS et al. 2002).

Em equinos é indicada a avaliação dos ácidos biliares séricos totais, GGT e a biópsia hepática. Esses exames são úteis para identificação de diferentes tipos de doenças hepáticas nessa espécie. Nos estágios iniciais de disfunção hepática, a SDH é a indicada. A concentração de amônia plasmática pode-se encontrar significativamente elevada em comparação com equinos clinicamente normais, mas nem sempre é

única passagem pelo fígado normal, evitando a sua chegada ao cérebro onde podem atuar como neurotransmissores falsos e causar vários sinais clínicos neurológicos (KELLY 2002). A base morfológica desses sinais neurológicos é uma degeneração esponjosa no sistema nervoso central causada pela hiperamonemia. Estão aumentados os níveis de amônia no sangue e de glutamina no líquido cefalorraquidiano (HOOPER et al. 1974, HOOPER et al. 1975).

A degeneração esponjosa (*status spongiosus*), que ocorre por um edema intramielínico, é mais pronunciada na substância branca do mesencéfalo, base do encéfalo, nos pedúnculos cerebelares e na junção entre substância branca e cinzenta (ILHA et al. 2001, MENDEZ et al. 1987, BARROS et al. 1987). É provável que existam diferenças entre as espécies na patogênese e manifestação da encefalopatia hepática. A mielinopatia espongiforme que ocorre na maioria das espécies aparentemente não ocorre no homem e no cavalo. Ao invés disso, nestas espécies, observamos um aumento no tamanho dos astrócitos, que neste caso são denominados de astrócitos Alzheimer tipo II (KELLY 1993).

#### **Diagnóstico da insuficiência hepática em ruminantes e eqüinos**

Os sinais clínicos de insuficiência hepática são variados e isso pode representar uma dificuldade na interpretação e confirmação do diagnóstico de insuficiência hepática por parte dos veterinários de campo. Portanto, para o diagnóstico é necessária a utilização de métodos complementares como a biópsia e avaliação das enzimas hepáticas.

A biópsia hepática é usada extensamente como um método de diagnóstico de lesões hepáticas difusas em trabalhos experimentais. Ela requer habilidade e conhecimento anatômico. A principal deficiência do método reside na obtenção de amostras pequenas, e, a menos que a alteração hepática seja difusa, a amostra pode não ser representativa. O método pode ser repetido várias vezes no mesmo animal sem causar transtornos. As amostras devem medir no mínimo 7 mm, obtendo-se tecido suficiente para um exame histológico adequado ou mesmo uma análise química (Cu, por exemplo) (KELLY 2002). O maior perigo é a ocorrência de uma falha, abordando o hilo e lesando vasos sanguíneos de grande calibre ou ductos biliares. Se o fígado se apresentar encolhido ou o acesso for muito caudal, nenhuma amostra será colhida. Se a

acompanhada por declínio na concentração de uréia plasmática. Uma queda na concentração de glicose plasmática é um mau prognóstico (RADOSTITS et al. 2002).

O proteinograma é um exame necessário para se detectar a possível causa do edema. A insuficiência hepática leva a uma falha na síntese de aminoácidos e proteínas, principalmente albumina, que é manifestada por emagrecimento e queda dos níveis das proteínas plasmáticas, a qual pode ser significativamente acentuada para causar edema, uma vez que ocorre queda da pressão osmótica do plasma (KELLY 1993, KELLY 2002; RADOSTITS et al. 2002).

A AST, conhecida também pelo nome de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), é encontrada principalmente no fígado, nos eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco. Normalmente é utilizada para avaliar lesão muscular em conjunto com creatina-quinase (CK) e lactato-desidrogenase. Em ruminantes e eqüinos é usada também para investigar doenças hepáticas (KERR 1989), devido a suas altas concentrações no fígado, porém não é específica para o diagnóstico das hepatopatias (RADOSTITS et al. 2002).

A GGT está presente em todas as células com exceção do músculo. Apresenta grande atividade nos rins e no fígado, mas somente aquela de origem hepática é encontrada no plasma, pois a de origem renal é excretada na urina. O aumento da atividade dessa enzima ocorre, em todas as espécies examinadas, após colestase. A avaliação da GGT tem grande vantagem para o diagnóstico de colestase em ruminantes, por ser uma enzima originária do tecido biliar hepático (membranas canaliculares de ductos biliares), e o aumento da sua atividade associa-se somente com colestase intra e extra-hepática e com proliferação de ductos biliares (SEAWRIGHT 1978). A GGT normalmente está limitada ao retículo endoplasmático liso, onde o sistema de oxidase mista é ativo. Os alcalóides pirrolizidínicos (AP) são ativados por este sistema causando lesões nos hepatócitos e liberação da GGT no soro (CURRAN et al. 1996). Quando for observado aumento nas enzimas, principalmente GGT deve-se fazer uma biópsia hepática a fim de avaliar a intensidade das lesões hepáticas.

A bilirrubina (BIL) existe no soro sob duas formas: indireta ou não conjugada (BIL proteínas plasmáticas) e direta ou conjugada (diglicuronato de BIL) e a soma das duas representa a BIL total. O exame laboratorial do soro, visando à detecção de quantidades relativas de BIL não-conjugada e BIL conjugada é essencial na determinação da presença e da causa de icterícia (COLES et al. 1984; SMITH 2006). Nas lesões hepáticas ou do trato biliar ocorre queda na excreção de BIL. Nas anemias

hemolíticas ocorre aumento na produção de BIL. O acúmulo de BIL conjugada resulta em icterícia mais pronunciada que a causada por quantidade similar de BIL não conjugada, daí o resultado de que a icterícia mais pronunciada é geralmente observada nos casos de lesão obstrutiva biliar ou hepática. Nas anemias hemolíticas estão elevados os níveis de BIL não-conjugada (SMITH 2006).

ALT, também conhecida como transaminase-glutâmico-pirúvica, ocorre em tecidos com metabolismo ativo de aminoácidos como o fígado, rins, músculo esquelético e miocárdio. De forma geral, em primatas, cães, gatos, coelhos e ratos, a ALT pode ser considerada uma enzima indicadora de dano hepático. Já em suínos, eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos, ALT tem pouco valor diagnóstico, uma vez que é encontrada em concentrações muito baixas no fígado dessas espécies (SCHEFFER & GONZÁLEZ 2006).

A FA está amplamente distribuída no organismo (osteoblastos, mucosa intestinal, células renais, hepáticas e placentárias) de modo que, isolada, não é específica para nenhum órgão. Nos distúrbios hepáticos detecta-se o aumento de sua atividade no soro em decorrência de colestase por obstrução dos canalículos biliares (KANEKO, 1989). Nem toda hepatopatia significativa causa um aumento de FA (SCHEFFER & GONZÁLEZ 2006). Esta enzima, apesar de não ser hepato-específica, aumenta nos casos de danos hepáticos em decorrência de sua liberação na superfície sinusoidal dos hepatócitos e na regurgitação das iso-enzimas biliares nos casos de colestase. Nas toxicoses por AP ocorrem nas duas situações (CRAIG et al. 1991).

A enzima Glutamato desidrogenase (GLDH) é utilizada para avaliar necrose hepática em ovinos, caprinos e bovinos. Pode aumentar também no parto e associada a obstruções dos ductos biliares (TENNANT 1997). Normalmente a GLDH tem resposta mais rápida do que a GGT, mas também volta ao normal mais rapidamente (MULLER 2001).

Arginase (ARG) encontra-se aumentada após uma injúria aguda do fígado, retornado aos valores normais mais rapidamente que a ALT e AST. Hepatites necróticas crônicas podem manter níveis elevados, com mau prognóstico. A ARG já foi demonstrada em várias espécies, mas pode ter valor diagnóstico em eqüinos, bovinos, ovinos, caprinos e cães (TENNANT 1997).

A SDH é uma enzima com meia vida muito de no máximo 24-48 horas e apresenta um pico logo após a lesão retornando aos valores normais em cerca de três dias. Por este motivo deve ser analisada no início da doença (MEYER et al. 1995). É

particularmente indicada em eqüinos para diagnosticar lesão hepatocelular aguda, mas também pode ser utilizada em ruminantes, substituindo a GLDH. É uma enzima seletiva como indicador de função hepática em ovinos e bovinos (RADOSTITS et al. 2002). A SDH e a ARG são enzimas mais específicas de função hepática em ruminantes, porém, é uma análise mais complicada e de alto custo.

A concentração de ácidos biliares séricos é descrita como um indicador sensível e específico de doença hepatobiliar no homem e nos animais. Em bovinos os ácidos biliares totais são indicadores mais específicos e sensíveis de uma variedade de doenças hepáticas, correlacionando-se significativamente com o grau de lesão, quando comparados com outros testes da função hepática. Em eqüinos, as concentrações de ácidos biliares séricos totais também são indicadores sensíveis de várias doenças hepáticas, sendo mais úteis quando combinadas com outros testes de função hepática (RADOSTITS et al. 2002).

O colesterol é de importância diagnóstica apenas em pequenos animais. Em herbívoros a concentração é normalmente muito baixa e um aumento não tem associação específica com qualquer quadro (KERR 2003). Elevações no colesterol sérico são observadas na obstrução biliar extra-hepática (MEYER et al. 1995)

A depuração de substâncias químicas (corantes como a bromossulfaleína ou a indocianina verde) pode fornecer importantes indícios de falha hepática, no entanto, seu uso é limitado em função do alto custo e do tempo necessário para a sua utilização (KELLY 2002).

## **MECANISMOS DE AÇÃO, SINAIS CLÍNICOS E PATOLOGIA DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS QUE CAUSAM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA.**

### **Carboxiatractilosídeos (CAT)**

Glicosídeos são éteres que contém uma metade formada por carboidratos e outra metade formada por não-carboidratos, unidas a um grupo éter. Os CAT são glicosídeos triterpenóides responsáveis pelo quadro de insuficiência hepática aguda em ruminantes. São encontrados em *Cestrum parqui* e *Xanthium cavanillesii* (CHEEKE 1998). Em outras plantas que causam o mesmo tipo de lesão ainda não se conhecem os princípios tóxicos. Os CAT causam inibição da respiração das mitocôndrias e da síntese de ATP (VIGNAIS et al. 1962), inibindo o transporte de ADP/ATP através da membrana da

mitocôndria e alterando o processo de fosforilação oxidativa pelo bloqueio da translocação da adenina nucleotídeo nessa organela (LUCIANI et al. 1978).

Os sinais clínicos na intoxicação por CAT em bovinos e ovinos são agudos e consistem de apatia, anorexia, parada dos movimentos ruminais, dores abdominais, tenesmo retal com discreto prolapso de reto, sudorese, desidratação progressiva com retração dos globos oculares e sinais nervosos caracterizados por incoordenação motora, tremores musculares generalizados e agressividade. Os animais investem à aproximação de pessoas, porém caem ao solo com facilidade manifestando sinais de fraqueza, às vezes apoiando a cabeça em obstáculos. Na fase terminal apresentam cegueira, decúbito lateral com movimentos de pedalagem, coma e morte. O curso clínico pode ser superagudo ou agudo, sendo, na maioria dos casos de 1 a 3 dias (RIET-CORREA et al. 1986, DRIEMEIER et al. 1999, LORETTI et al. 1999, COLODEL et al. 2000).

As lesões macroscópicas de importância são observadas no fígado e se caracterizam por acentuação do padrão lobular na superfície capsular e de corte. As lesões podem variar em intensidade, de moderada a acentuada. Na superfície de corte podem ser encontradas áreas vermelho-escuras alternadas com áreas claras amareladas, conferindo ao órgão um aspecto de noz-moscada. Ainda podem ser encontradas hemorragias puntiformes distribuídas aleatoriamente na superfície natural e de corte. O fígado pode estar aumentado de volume e com os bordos arredondados. Nos casos mais agudos o fígado pode estar aumentado de tamanho, congesto, mas sem aspecto de fígado em noz moscada. A vesícula biliar pode estar distendida e com edema gelatinoso e translúcido de sua parede. Esta última lesão também pode ser encontrada no mesentério, nos ligamentos da curvatura maior e menor do abomaso e na região perirrenal. Observa-se hidropericárdio, discreto edema e acentuado avermelhamento difuso das dobras da mucosa do abomaso e hemorragias múltiplas, sob a forma de petéquias, equimoses e sufusões, disseminadas no tecido subcutâneo, omento, mediastino, serosas, mucosas da vesícula biliar, bexiga, timo, linfonodos, úbere, epicárdio e endocárdio. No reto há pequena quantidade de fezes ressequidas, esverdeadas, sob a forma de esferas, recobertas por muco e estrias de sangue coagulado. No rúmex e no retículo podem ser encontrados folhas ou frutos das plantas (RIET-CORREA et al. 1986, DRIEMEIER et al. 1999, LORETTI et al. 1999, COLODEL et al. 2000).

A principal lesão microscópica ocorre, também, no fígado de forma difusa e consiste em acentuada necrose coagulativa hepatocelular centrolobular acompanhada de



congestão e hemorragias. Necrose massiva pode ser observada nos casos mais graves. Alterações degenerativas, como vacuolização de hepatócitos e glóbulos eosinofílicos, podem ser observadas principalmente próximas ao limite da área com necrose e hepatócitos morfológicamente normais. Os hepatócitos necróticos estão dissociados, diminuídos de tamanho, com citoplasma fortemente eosinofílico, condensado, homogêneo e refringente e com núcleos picnóticos, cariorréticos ou ausentes. Em alguns casos necrose massiva pode ser observada, com a lesão se estendendo aos hepatócitos periportais. Pequena quantidade de neutrófilos e de células mononucleares podem preencher a luz de veias centrolobulares e sublobulares e entremear-se nos extensos focos necróticos. A lesão centrolobular pode atingir cerca de dois terços do lóbulo hepático a partir da veia central. A zona intermediária do lóbulo pode apresentar, além da necrose, estreita faixa de hepatócitos muitos tumefeitos, vesiculares ou espumosos, com núcleo muitas vezes picnótico, com evolução para cariólise. Hepatócitos da zona periportal podem estar tumefeitos, com citoplasma granular ou microvesicular. Pode ser observado, também, ativação das células de Kupffer e tumefação das células endoteliais dos sinusóides (DRIEMEIER et al. 1999, LORETTI et al. 1999, COLODEL et al. 2000).

DRIEMEIER et al. (1999) não constataram alterações microscópicas no sistema nervoso central, apesar da gravidade das lesões encontradas no fígado. Outros autores relatam lesões microscópicas no sistema nervoso na intoxicação por *Xanthium* spp. incluindo cromatólise associada à astrogliose e espongirose no cérebro e mesencéfalo, indicando degeneração neuronal e edema. Menciona-se ainda degeneração neuronal isquêmica, congestão na maior parte do cérebro e hemorragias focais no cérebro e cerebelo (WITTE et al. 1990, SANTOS 1997).

Lesões ultra-estruturais descritas na intoxicação de ovinos por *Xanthium cavanillesii* consistem de dilatação dos espaços de Disse que se encontram preenchidos por hepatócitos necróticos e neutrófilos. Adicionalmente pode ocorrer lesão acentuada das células endoteliais dos sinusóides, ruptura de segmentos da parede desses capilares com o surgimento de áreas de descontinuidade acompanhadas de agregação plaquetária. Nos hepatócitos observam-se acentuada dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, tumefação de mitocôndrias, desaparecimento de grânulos de glicogênio e picnose nuclear (COLODEL et al. 2000).

## Alcaloides pirrolizidínicos (AP)

Alcalóides pirrolizidínicos são compostos que contém nitrogênio, usualmente no anel heterocíclico e são geralmente substâncias básicas. O núcleo dos AP contém 2-5 anéis. São responsáveis pela toxicidade de vários grupos de plantas (CHEEKE 1998). A maioria é constituída por ésteres de dois aminoácidos, retronecina e heliotridina, e ocorrem em três grupos – monoésteres, não-cíclicos (abertos) e diésteres cíclicos - em ordem crescente de toxicidade. Para serem hepatotóxicos necessitam de ligação dupla 1,2 no núcleo pirrolizidínico e uma ramificação no grupamento éster. N-óxidos de AP podem ser convertidos no trato alimentar em base nitrogenada livre do tóxico. Uma lista completa dos AP seria muito longa, pois só o *Echium plantagineum* contém pelo menos 10 tipos tóxicos para os animais de fazenda. Alguns destes alcalóides têm também efeito sobre os pulmões, como a monocrotalina, ou sobre o rim (RADOSTITS et al. 2002). Os AP causam danos irreversíveis ao fígado, alguns deles inclusive são carcinogênicos (CHEEKE 1994).

As principais plantas tóxicas que contém AP são as da família Boraginaceae (todos os gêneros, incluindo *Echium* e *Heliotropum*), Asteraceae, gêneros *Senecio* e *Eupatorium* e Leguminosae gênero *Crotalaria* (TOKARNIA et al. 2000). Dentro dessas famílias, alcalóides tóxicos são encontrados principalmente em *Senecio*, *Crotalaria* e *Heliotropium* (RIDKER et al. 1985) e também em espécies de *Symphytum* (Confrey) (RIDKER et al. 1985, PRAKASH et al. 1999).

Os AP contidos nas plantas não são quimicamente reativos e quando ingeridos, grande parte deles é excretado inalterado. No entanto, podem ser metabolizados no fígado e transformar-se em produtos tóxicos. As principais rotas de metabolismo hepático dos AP são a hidrólise pelo éster, a N-oxidação e a desidrogenação. As duas primeiras reações representam mecanismos de desintoxicação, enquanto que a desidrogenação forma os pirróis e está associada com a toxicidade dos alcalóides. O equilíbrio entre essas reações é que poderá determinar o efeito tóxico dos AP para o organismo animal (MATTOCKS 1986). Os pirróis são eletrofilicos e reagem com componentes teciduais nucleofilicos, como ácidos nucleicos e proteínas (SPERL et al. 1995). Como o fígado é local de produção desses pirróis tóxicos, ele é um dos principais órgãos alvo, seguido pelos pulmões (FOX et al. 1978). Os pirróis lesam as células hepáticas por inibição da mitose (efeito alquilante), causando megalocitose, necrose e redução no número de hepatócitos, que são substituídos por tecido fibroso;

em virtude disso, levam ao aparecimento do quadro clínico e morte decorrente de disfunção hepática (SEAWRIGHT 1991). Parte dos pirróis produzidos no fígado escapam para a circulação geral, causando lesões em outros tecidos, sendo a causa da nefrose e da pneumonia intersticial que ocorrem algumas intoxicações (RADOSTITS et al. 2002). Outros órgãos, como o pulmão, também produzem pirróis por conterem enzimas do sistema citocromo P450 (KIM et al. 1993).

Diferenças entre as espécies animais no tocante a suscetibilidade a intoxicações pelos AP são relatadas na literatura. A resistência de algumas espécies é o resultado do balanço entre as reações de bioativação, desintoxicação e excreção de alcalóides (CHEEKE 1994). Os bovinos e eqüinos são bastante susceptíveis à intoxicação por AP, sendo 30-40 vezes mais susceptíveis do que os ovinos e caprinos. A diferença parece estar relacionada à capacidade do animal em detoxificar os AP no fígado, provavelmente relacionada à dieta consumida antes da domesticação. Pequenos ruminantes são menos seletivos no tocante a ingestão de alimentos, desenvolvendo, em virtude disso, resistência às toxinas (CKEEKE 1994; RADOSTITS et al. 2002). A resistência dos ovinos é atribuída, também, a uma maior quantidade de microorganismos no rúmen capazes de biotransformar esses alcalóides com maior eficiência que os bovinos (CRAIG et al. 1992). As diferentes respostas ou resistência individual dos animais aos AP podem refletir: 1) A detoxificação bacteriana no trato gastrintestinal, 2) A taxa de conversão, no fígado, dos AP a pirróis tóxicos e 3) A capacidade anti-oxidativa individual do animal. A quantidade de AP ingerida na alimentação também é importante (CRAIG et al. 1991). Alguns autores consideram que as diferenças no metabolismo hepático dos ovinos são mais importantes do que a flora microbiana do rúmen. Diferenças entre raças também são relatadas; experimentos demonstraram que ovinos da raça Merino são relativamente resistentes à intoxicação por *E. plantagineum* comparados a outras raças (CHEEKE 1994).

Em bovinos o quadro clínico caracteriza-se por insuficiência hepática em conseqüência de lesões crônicas do fígado. Os sinais clínicos são variáveis; geralmente há encefalopatia hepática com apatia ou hiperexcitabilidade, agressividade, pressão da cabeça contra objetos, andar compulsivo ou em círculo e, ocasionalmente, galope descontrolado e violento. Decréscimo nos reflexos dos nervos cranianos, ataxia e fraqueza também podem ser observados. Tenesmo, diarréia e, ocasionalmente, prolapso retal são característicos deste quadro. O curso clínico é, geralmente, de 24 a 96 horas. Alguns bovinos apresentam emagrecimento progressivo, com diarréia ou não, com um

curso clínico que pode ser de até 3 meses, podendo observar-se antes da morte encefalopatia hepática, ou os animais permanecem em decúbito até a morte. Podem observar-se, também, ascite, fotossensibilização, icterícia e edemas de membros e barbeta (TOKARNIA & DOBEREINER 1984a, BARROS et al. 1987, MÉNDEZ et al. 1987, KARAM et al. 2004, NOBRE et al. 2004). Os casos de fotossensibilização apresentam um curso clínico mais prolongado que os casos de encefalopatia hepática, que pode ser de 30-60 dias (SCHILD et al. 2006).

Na necropsia de bovinos intoxicados o fígado está firme, com superfície irregular e áreas brancas misturadas com áreas vermelho-escura e com aumento no padrão lobular. Há edema do mesentério e pregas submucosa do abomaso. Icterícia moderada, ascite, hidropericárdio e hidrotórax também podem ser observados. As lesões histológicas do fígado se caracterizam por fibrose, principalmente periportal, megalocitose e proliferação de células dos ductos biliares (TOKARNIA & DOBEREINER 1984a, BARROS et al. 1987, MÉNDEZ et al. 1987, KARAM et al. 2004)

Na intoxicação pelos AP em ovinos podemos observar três quadros clínicos: intoxicação crônica com fotossensibilização e/ou encefalopatia hepática; intoxicação crônica por cobre secundária; e intoxicação aguda.

Na intoxicação crônica os animais apresentam sinais clínicos variáveis, que incluem emagrecimento progressivo, apatia, fraqueza, perturbações neurológicas como depressão, andar a esmo e desequilibrado, pressão da cabeça contra objetos, icterícia e fotossensibilização. Na necropsia, o fígado apresenta áreas avermelhadas entremeadas por áreas pálidas, firmes ao corte e superfície capsular irregular, espessada e com fibrina. A vesícula biliar está distendida e observa-se ascite, edema de abomaso e do mesentério e *shunts* portossistêmicos. Histologicamente observa-se fibrose periportal, proliferação de células epiteliais de ductos biliares, hepatomegalocitose e bilestase. No encéfalo observam-se microcavitações nas substâncias branca e cinzenta, características de encefalopatia hepática (ILHA et al. 2001, DANTAS et al. 2004).

Achados ultra-estruturais no fígado incluem graus variáveis de degeneração hepatocelular caracterizada pelo acúmulo de numerosas gotas lipídicas no citoplasma das células hepáticas e presença de lisossomos carregados de material eletrodense que, na maioria dos casos, correspondem à lipofuscina-ceróide. Adicionalmente, há discreta dilatação do retículo endoplasmático rugoso e moderada hiperplasia do retículo

endoplasmático liso em algumas regiões do citoplasma dos hepatócitos (ILHA et al. 2001).

A intoxicação por cobre secundária à intoxicação pelos AP em ovinos está associada ao acúmulo excessivo desse metal no fígado em consequência da insuficiência hepática provocada pelos AP. O Cu é liberado causando hemólise, hemoglobinúria e icterícia (ILHA et al. 2001, NOBRE et al. 2005).

A intoxicação aguda em ovinos pela ingestão de *C. retusa* foi relatada por Dantas et al. (1999) e Nobre et al. (2005). Os sinais observados incluem anorexia, severa depressão, moderada icterícia, incoordenação e decúbito. Os animais morrem 12 horas após os primeiros sinais clínicos. Na necropsia, o fígado apresenta aspecto de noz moscada com presença de fibrina na superfície. A vesícula biliar encontra-se distendida. Hemorragias no endocárdio e pericárdio, hidropericárdio, hidrotórax e ascite também são observados. Sementes e vagens da planta podem ser encontradas em grandes quantidades no rúmen dos animais mortos. Lesões histológicas no fígado caracterizam-se por necrose centrolobular. As áreas necróticas estão ocasionalmente circundadas por hepatócitos vacuolizados.

Eqüinos intoxicados por AP apresentam icterícia, encefalopatia hepática e fotossensibilização. Na encefalopatia hepática os animais apresentam apatia ou hiperexcitabilidade, pressão da cabeça contra objetos, andar compulsivo ou em círculo e, ocasionalmente, galope descontrolado e violento. Decréscimo nos reflexos dos nervos cranianos, ataxia e fraqueza também podem ser observados. Outros sinais clínicos incluem anorexia, perda de peso, fotossensibilização e icterícia. À necropsia podemos observar fígados duros, com superfície irregular e áreas brancas misturadas com áreas vermelho-escuras e com aumento no padrão lobular. Icterícia moderada, ascite, hidropericárdio e hidrotórax também podem ser observados. As lesões histológicas do fígado caracterizam-se por fibrose, principalmente periportal, megalocitose e proliferação de células dos ductos biliares. Áreas multifocais de hemorragias centrolobulares ou mediozonais são observadas. Necrose hemorrágica centrolobular pode estar presente. Os pulmões podem apresentar pneumonia intersticial fibrosante difusa, com espessamento de septos interalveolares, edema e infiltrado inflamatório mononuclear e, principalmente, macrófagos espumosos. No sistema nervoso pode-se observar congestão, discretas hemorragias, principalmente perivasculares e astrócitos Alzheimer tipo II, principalmente no núcleo caudato e no córtex, isolados ou em grupos (NOBRE et al. 2004a,b).

## Furanossesquiterpenos (FST)

Terpenos e terpenóides são substâncias derivadas do carbono 5 do isopreno (CHEEKE 1998). Os sesquiterpenos são tóxicos comuns em plantas. Os subgrupos deles incluem: sesquiterpenos furanóides (furanossesquiterpenos), ipomeanóis, ngaiones, lactonas sesquiterpênicas e esporidesmina. Os FST como o ngaione e a miodesmona são óleos essenciais presentes em *Lasiospermum bipinnatum* e estão contidos também nas folhas e frutos do *Myoporum* spp. As espécies de *Myoporum* que causam lesão hepática em ruminantes incluem *M. laetum*, *M. deserti*, *M. tetrandum* e *M. tetrandum affinis* (RADOSTITS et al. 2002). Os óleos essenciais presentes em *M. deserti* foram investigados quimicamente e ao menos 11 diferentes FST foram isolados sendo todos similarmente tóxicos para animais de laboratório. Experimentos com ratos e coelhos que receberam ngaione demonstraram que esse óleo causa um padrão regular de necrose mediozonal nas células do parênquima hepático, apesar de que a necrose centrolobular ou periportal pode ser vista em alguns animais (SEAWRIGHT et al. 1978). No Brasil, a intoxicação experimental de ovinos e bovinos foi descrita por Raposo et al. (1998a,1998b, 2003, 2004). Nesses casos a necrose hepática não era mediozonal e sim periportal.

A biotransformação em metabólitos tóxicos é feita pelas oxidases de função mista microsomal (MMFO), as quais ocorrem em maior concentração na zona centrolobular, em concentração intermediária na mediozonal e em menor concentração na região periportal (KELLY 1993). O ngaione e outros óleos FST provenientes do *Myoporum* requerem metabolismo das MMFO para se transformar em um composto intermediário responsável pela lesão hepática. Quando a atividade do sistema MMFO é baixa, os hepatócitos da região periportal não metabolizam suficientemente o ngaione permanecendo então intactos. Já as outras células com funcionamento normal do MMFO estariam mais suscetíveis aos efeitos danosos provocados pelo ngaione (SEAWRIGHT et al. 1978).

A hiperplasia acentuada do retículo endoplasmático liso (REL) observada nos animais intoxicados é uma alteração ultra-estrutural que pode ser interpretada como uma resposta do mecanismo de desintoxicação hepática. O REL atua na biotransformação de drogas não-polares, pelo sistema das oxidases de função mista da citocromo P-450 (MARZELLA & TRUMP 1991). Tem sido demonstrado que diferentes rebanhos de ovinos podem apresentar diferentes níveis de atividade média de

suas MMFO, e que a atividade das enzimas sob condições de campo pode variar com a estação do ano e com a dieta (SEAWRIGHT et al. 1978).

A intoxicação por FST em ovinos e bovinos causa icterícia, fotossensibilização, estase ruminal, constipação, tenesmo e dor abdominal. Outros sinais incluem depressão, fezes ressequidas com muco e sangue, mucosas vermelhas, tenesmo, ranger de dentes e dispnéia. Na necropsia observa-se icterícia e fígado aumentado de tamanho, amarelo ou levemente alaranjado. A vesícula biliar está distendida e com parede edemaciada. Pode-se observar ainda hemorragias petequiais difusas no tecido subcutâneo e nas serosas; presença de líquido seroso nas cavidades; hemorragias no pericárdio, no endocárdio, na mucosa dos intestinos delgado e grosso, e fezes duras recobertas por sangue coagulado no reto. Na histologia as lesões não têm um padrão definido de necrose, que pode ser periportal, centrolobular ou mediozonal (ALLEN et al. 1978; RAPOSO et al. 1998a; RAPOSO et al. 1998b; RAPOSO et al. 2003 e RAPOSO et al. 2004). Essas variações são atribuídas a variações individuais ou à concentração do princípio tóxico da planta e a atividade das MMFO. O uso de pré-tratamentos com fenobarbital e óleo de *Melaleuca linariifolia*, que acentuam a atividade das MMFO hepáticas leva a necrose periportal. ALLEN et al. (1978) e RAPOSO et al. (2003) concluíram que a zona de localização da lesão na intoxicação por *Myoporum* estava relacionada à prévia utilização das MMFO hepáticas induzidas por compostos alimentares. Outros autores observaram em casos espontâneos necrose hemorrágica mediozonal (ODRIOZOLA et al. 1987) e periportal (JERRETT & CHINNOCK 1983), e necrose periportal em estudos experimentais (FORD & RIVERA 1978; JERRETT & CHINNOCK 1983). A ocorrência de intoxicação por *Myoporum* spp. ou outras por substâncias hepatotóxicas está na dependência de sua metabolização a metabólitos intermediários pelo fígado os quais são hepatotóxicos. De acordo com RAPOSO et al. (2003), os bovinos demonstraram menor sensibilidade aos efeitos de *Myoporum laetum*. Esse fato provavelmente está associado a uma menor atividade das enzimas microsomais hepáticas nesta espécie. Além dos diferentes padrões de necrose hepática mencionados anteriormente, outros achados histológicos observados na intoxicação de ovinos por *Myoporum laetum* incluem vacuolização de hepatócitos, fibrose portal e proliferação de ductos biliares. Estudos ultra-estruturais revelam hiperplasia do retículo endoplasmático liso, tumefação de hepatócitos, desgranulação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, presença de cristais aciculares, retenção biliar, tumefação de mitocôndrias e várias outras alterações degenerativas. Em bovinos, tanto os achados histológicos, quanto os ultra-

estruturais são menos evidentes do que em ovinos (RAPOSO et al. 1998a, RAPOSO et al. 2003, RAPOSO et al. 2004). Há correlação entre sinais clínicos, lesões hepáticas e a elevação dos níveis séricos de AST, GGT e BLT na intoxicação de ovinos por *M. laetum* (RAPOSO et al. 2004).

### **Triterpenos**

Os ácidos triterpênicos (Lantadene A e B) estão presentes em *Lantana* spp. No Brasil a intoxicação por *L. camara*, *L. tiliaefolia* e *L. glutinosa* têm sido diagnosticada (SILVA et al. 1971; RIET-CORREA et al. 1984; TOKARNIA et al. 1984; LÁU 1990; BRITO 1995; TOKARNIA et al. 1999; BRITO et al. 2004). As toxinas da *Lantana* são absorvidas rapidamente pelo trato alimentar após da ingestão da planta; chegam até o fígado pela circulação portal e dentro de poucos minutos provocam o quadro de colestase intra-hepática (PASS et al. 1978).

Os triterpenos são metabolizados pelas enzimas do sistema microsomal hepático se transformando em metabólitos ativos. Essas toxinas causam colestase intra-hepática (retenção de bile no fígado) pela inibição da secreção da bile pelos hepatócitos. Os metabólitos do lantadene provocam lesão na membrana das células dos canalículos biliares. As principais conseqüências do impedimento do fluxo biliar são fotossensibilização, icterícia e estase ruminal. Fotossensibilização ocorre devido à inibição da excreção biliar de filoeitrina. Icterícia é o resultado do impedimento da excreção biliar de bilirrubina. Estase ruminal que é proeminente na intoxicação pela *Lantana* ocorre aparentemente devido ao reflexo hepato-ruminal, que diminui a motilidade do rúmen, processo que é iniciado pela injúria do tecido hepático (CHEEKE 1998). Essas substâncias além da lesão hepática provocam também nefrose, (RADOSTITS et al. 2002).

A intoxicação por *Lantana* spp. está associada à perda de ATPases canaliculares que são distribuídas na membrana canalicular dos ovinos. Foi demonstrado que dentro de 6 horas após administração oral da planta, há uma perda de ATPases na região centrolobular ou periacinar. Após 24 horas há uma perda total de ATPases no lóbulo hepático. Seis horas após a ingestão da planta as microvilosidades das células canaliculares estão fragmentados, e 24 horas depois, o colapso canalicular é completo. Em alguns casos, entretanto, a região periportal é poupada (PASS 1977).



Embora a secreção biliar esteja reduzida na intoxicação por *Lantana* spp., aparentemente os hepatócitos conservam seu metabolismo funcional. Isso é evidenciado pelo fato de que 60% da bilirrubina retida é conjugada (PASS 1977). O nível de bilirrubina sérica nos animais intoxicados é muito maior do que nos animais saudáveis. Nos animais saudáveis 30% da bilirrubina circulante está na forma conjugada. A conjugação da bilirrubina ocorre pela atividade do sistema oxidase de função mista no retículo endoplasmático agranular dos hepatócitos. Foi demonstrado um aumento da área do retículo endoplasmático agranular nos hepatócitos de animais intoxicados demonstrando que estes também são afetados na intoxicação pelos triterpenos. A distensão da vesícula biliar é outro achado importante da intoxicação pela *Lantana*. É atribuída a paralisia do músculo liso da vesícula biliar (PASS 1977).

*Lantana* spp. são plantas com sabor desagradável e os bovinos só as ingerem se outros alimentos são escassos ou em caso de animais transportados. A susceptibilidade de ovinos é semelhante à dos bovinos (BRITO et al 2004), mas os bovinos taurinos são mais suscetíveis do que os zebuínos (RADOSTITS et al. 2002).

O quadro clínico-patológico observado na intoxicação por *Lantana* spp. é caracterizado por: acentuada icterícia, globos oculares retraídos, marcado emagrecimento, urina de coloração amarelada, constipação, fezes ressequidas, pêlos arrepiados, fraqueza e fotossensibilização nas partes despigmentadas da superfície do corpo, caracterizadas inicialmente por vermelhidão (congestão), edema, aparecimento de exsudato na superfície das áreas afetadas, seguidas por formação de fendas e de mumificação da pele nas partes afetadas. Os animais podem apresentar sinais nervosos incluindo andar lerdo, apatia, decúbito esternal com a cabeça encostada no flanco, desorientação, estado semelhante à embriaguez, andar em círculos e agressividade (SILVA et al. 1971; RIET-CORREA et al. 1984; TOKARNIA et al. 1984; LÁU 1990; BRITO 1995; TOKARNIA et al. 1999; BRITO et al. 2004). Importante ressaltar que existe uma variação na toxicidade das diferentes espécies de *Lantana* e dentro da mesma espécie oriundas de regiões distintas (BRITO et al. 2004).

Na necropsia observa-se icterícia generalizada e edema subcutâneo amarelo-intenso, localizado principalmente nos membros. O fígado apresenta-se aumentado de tamanho, de coloração alaranjada ou amarela. A vesícula biliar está distendida e edemaciada. Pode-se observar ainda hemorragias petequiais difusas no tecido subcutâneo e nas serosas, presença de líquido seroso nas cavidades; hemorragias no pericárdio, no endocárdio, na mucosa dos intestinos delgado e grosso, e fezes duras

recobertas por sangue coagulado no reto. As lesões microscópicas revelam, além de bilestase, alterações degenerativas nos hepatócitos periportais e nas células epiteliais dos túbulos uriníferos (TOKARNIA et al 1999).

### **Saponinas esteroidais**

Saponinas esteroidais são glicosídeos com núcleo tipo furostanólico ou espirostanólico, que contém uma ou várias cadeias de açúcares. Seu nome deriva da propriedade mais característica desse grupo de compostos, que é a formação de espuma persistente e abundante quando em solução aquosa (SANTOS 2000). As espécies de *Brachiaria* e outras plantas (*Panicum* spp., *Tribulus terrestris*, *Agave lechiguilla* e *Nathercium ossifragum*) contêm saponinas esteroidais que estão associadas com a deposição de material cristalóide no sistema biliar, colangite e fotossensibilização (MILES et al. 1991; CRUZ et al. 2001).

A hidrólise das saponinas de *Brachiaria decumbens* (protodioscina) e outras plantas (dicotomina em *Panicum* spp.) resulta nas sapogeninas diosgenina e iamogenina (MEAGHER et al. 1996), que após serem metabolizadas passarem no trato digestivo dos animais vão resultar na sapogeninas epismilagenina e episarsasapogenina, respectivamente, que são responsáveis pela formação dos cristais biliares. Mecanismo provável para a formação dos cristais biliares envolve a hidrólise dos açúcares da saponinas pelo metabolismo ruminal, seguida pela redução da dupla ligação (C5-C6), epimerização do radical 3- $\beta$ -OH para 3- $\alpha$ -OH e, finalmente, conjugação com o ácido glicurônico. Os glicuronídeos de epismilagenina e episarsasapogenina ligam-se com os íons de cálcio e formam sais insolúveis que se depositam na forma de cristais (MILES et al. 1991). Os cristais causam inflamação e obstrução do sistema biliar, além de necrose dos hepatócitos periportais resultando em icterícia, fotossensibilização e hepatite. Encontram-se, também, cristais aciculares nos hepatócitos, células de Kupffer e células dos túbulos renais (RADOSTITS et al. 2002). O material cristalóide pode causar fotossensibilização e icterícia pelo bloqueio físico ao fluxo da bile, ou os metabólitos das saponinas podem causar uma colestase específica com ação similar ao Lantadene A (CRUZ et al. 2000).

Os ovinos são mais sensíveis do que os bovinos à intoxicação e os animais jovens são mais sensíveis que os adultos. No Brasil são descritos casos clínicos em bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos (LEMOS et al. 1996a; LEMOS et al. 1997;

LEMOS et al. 1998; TOKARNIA et al. 2000; SEITZ et al. 2004, ROZZA et al. 2004). Também são descritos casos de fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *B. humidicola* (BARBOSA et al. 2006).

Quando os animais são expostos ao sol apresentam inquietação, balançam a cabeça e as orelhas, esfregam ou coçam as áreas afetadas em objetos e procuram a sombra. As lesões de pele iniciam com eritema, seguido de edema, fotofobia e dor. Ocorre espessamento das partes afetadas da pele, com presença de exsudato e formação de crostas. O resultado é uma necrose e gangrena seca deixando a pele lesada com aspecto de casca de árvore que, finalmente, se desprende. São observados diferentes graus de icterícia, bilirrubinemia e bilirrubinúria (GRAYDON et al. 1991; TOKARNIA et al. 2000, LEMOS et al. 2002). As lesões são mais graves nas regiões dorsais do corpo e nas partes expostas ao sol quando os animais se deitam (RADOSTITS et al. 2002). As orelhas apresentam-se contorcidas e com os bordos voltados para cima, podendo haver ulcerações na parte ventral da língua, ceratite, opacidade de córnea e cegueira (LEMOS et al. 2002). Há um aumento significativo nos níveis de GGT e AST (LEMOS et al. 1996b; LEMOS et al. 2002).

Na necropsia, além das lesões de pele, de língua e oculares descritas anteriormente, podem ser observados diversos graus de icterícia, fígado aumentado de tamanho, amarelo-cobre, que se acentua ainda mais após um período de 24 horas de fixação em formol a 10% (DRIEMEIER et al. 1998), e aumento de consistência e extensas áreas de fibrose em casos mais crônicos. A vesícula biliar pode se apresentar distendida e com bile viscosa e espessa. Os rins podem estar escurecidos e a urina também pode ter coloração castanho-escura (LEMOS et al., 2002). Os linfonodos hepáticos e mesentéricos não apresentam alterações de tamanho ou alterações externas, mas na superfície de corte podem ser observadas inúmeras estriações paralelas de cor branca semelhantes a giz, dispostas em forma radiada paralela da cortical em direção à medular. Alguns linfonodos podem apresentar na região medular pequenos nódulos brancos semelhantes aos da região cortical, e que se projetam levemente na superfície de corte. Alguns animais podem apresentar, além disso, áreas vermelhas escuras irregulares distribuídas principalmente na cortical, por vezes intercaladas com finas estriações esbranquiçadas (DRIEMEIER et al. 1998).

Histologicamente encontram-se cristais nos ductos biliares e macrófagos espumosos, às vezes com cristais no citoplasma. Pode haver necrose e degeneração de hepatócitos periportais, proliferação de células dos ductos biliares, estase biliar,

colangite, pericolangite e fibrose periportal. Podem observar-se macrófagos espumosos nos linfonodos, baço. (LEMOS et al, 1996a; LEMOS et al., 1996b; LEMOS et al., 1996c; LEMOS et al., 1997; LEMOS et al, 1998; DRIEMEIER et al., 1998; LEMOS et al., 2002) e, ocasionalmente, no intestino (RIET-CORREA et al. 2002).

O estudo ultra-estrutural do fígado demonstra a presença de estruturas em forma de fendas com imagem negativa de cristais, presentes nos macrófagos e hepatócitos. Nesses últimos, pode-se observar acentuada hiperplasia do retículo endoplasmático liso. Muitas destas estruturas são delimitadas parcial ou totalmente por membrana. Nos linfonodos hepáticos e mesentéricos pode-se observar macrófagos contendo estruturas cristalóides semelhantes às contidas nos hepatócitos. Macrófagos degenerados e/ou em necrose também são visualizados (DRIEMEIER et al 1998).

### REFERÊNCIAS

- Allen J.G.; Seawright A.A.; Hrdlicka J. 1978. The toxicity of *Myoporum tetradum* (Boobialla) and myoporaceus furanoid essential oils for ruminants. Australian Veterinary Journal 54:287-292.
- Barbosa J.D.; Oliveira C.M.C.; Tokarnia C.H.; et al. 2006. Fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira, 26 (3): 147-153.
- Barros C.S.L.; Metzdzorf L.L.; Peixoto P.V. 1987. Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira. 7:101-107, 1987.
- Brito M.F. & Tokarnia C.H. 1995. Estudo comparativo da toxidez de *Lantana camara* var. *aculeata* em bovinos e ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 15(2/3):79-84.
- Brito M.F.; Tokarnia C.H.; Dobereiner J. 2004. A toxidez das diversas *Lantanas* para bovinos e ovinos no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 24 (3):153-159.
- Brum K.B.; Purisco E.; Lemos R.A.A.; Riet-Correa F. 2002. Intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em bovinos no Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras. 22:119-128.
- Canella C.F.C.; Tokarnia C.H.; Dobereiner J. 1968. Intoxicação por *Sessea brasiliensis* Toledo em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 3:333-340.
- Cattani C.S.O.; Colodel E.M.; Traverso S.D.; Correa A.M.R.; Driemeier D. 2004. Intoxicação experimental por *Dodonea viscosa* em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 24 (1): 31-34. p. 31-34.

- Cheeke P.R. 1994. A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. *Vet. Human Toxicol.* 36: 240-247.
- Cheeke, P.R. 1998. *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. 2º ed. Interstate, Danville, Illinois. 479 p.
- Coles E.H. 1984. Função hepática. In: COLES E.H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3.Ed. São Paulo: Manole, p.185-219.
- Colodel E. M.; Driemeier, D.; Pilati C. 2000. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 20 (1): 31-38.
- Colodel E.M.; Traverso S.D; Seitz A.L.; Oliveira F.N.; Driemeier D.; Gava A. 2003. Spontaneous poisoning by *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) in cattle. *Vet. Human toxicol.* 45: (3)147-148.
- Craig A.M.; Pearson E.G.; Meyer C. & Schmitz A. 1991. Clinicopathologic studies of tansy ragwort toxicosis in ponies: sequential serum and histopathological changes. *Equi. Vet. Sci.* 11: 261-281.
- Craig A.M.; Latham C.J.; Blythe L.L.; Schmotzer W.B. & O'Connor O.A. 1992. Metabolism of toxic pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) in ovine ruminal fluid under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2730-2736.
- Cruz C.; Driemeier D.; Pires V.S. 2000. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 42:142-145.
- Cruz C.; Driemeier D.; Pires V.S.; Schenkel E.P. 2001. Experimentally induced by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Stillwater. v. 73, p. 170-172.
- Curran J.M.; Sutherland R.J. & Peet R.L. 1996. A screening test for subclinical liver disease in horses affected by pyrrolizidine alkaloid toxicosis. *Aust. Vet. J.* 74: 236-240.
- Dantas A. F. M.; Nobre V. M. T. & Tabosa I. M. 1999. Intoxicação aguda por *Crotalaria* sp (Leguminosae) em ovinos na Paraíba, Brasil - Relato de caso. 9º Enapave, Belo Horizonte, p. 89. (Resumo).
- Dantas A.F.M.; Nobre V.M.T.; Riet-Correa F.; Tabosa I.M.; Júnior G.S.; Medeiros J.M.; Silva R.M.N.; Silva E.M.N.; Anjos B.L. 2004. Intoxicação crônica espontânea por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em ovinos na região do semi-árido paraibano. *Brasil. Pesq. Vet. Bras.* 24 (supl.): 18-19.
- Deutsch J.; Döbereiner J.V.; Tokarnia C.H. 1965. Fotossensibilidade hepatogênica em bovinos na intoxicação pela fava de *E. gummiferum*. *Proceedings. Congresso Internacional de Pastagens*, 9, São Paulo, p. 1279-1282.

Dobereiner J.; Tokarnia C.H.; Canella C.F. 1969. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht, a causa de mortandades em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropecuária Brasileira*. 4:165-193.

Dobereiner J.; Tokarnia C.H.; Purisco E. 1976. *Vernonia mollissima*, planta tóxica responsável por mortandade de bovinos no Sul do Mato Grosso. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 11:49-58.

Driemeier D.; Barros S.S.; Peixoto P.V.; Tokarnia C.H.; Dobereiner J. & Brito M.F. 1998. Estudos histológicos, histoquímicos e ultra-estrutural de fígado e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos ("foam cells"). *Pesq. Vet. Bras.* 18 (1): 29-34.

Driemeier D.; Irigoyen L. F.; Loretto A. P.; Colodel, E.M. & Barros C. S. L. 1999. Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 19(1): 12-18.

Ford E.J.H. & Rivera R. 1978. The modification of the dehydromyodesmone-induced hepatic lesion in cattle by microsomal drug metabolizing enzymes. *J. Comp. Path.* 88:365-380.

Fox D.W.; Hart M.C.; Bergeson P.S.; Jarret P.B.; Stillman A.E.; Huxtable R.J. 1978. Pirrolizidine (senecio) intoxication mimicking Reye syndrome. *J. Pediatr.* 93 (6): 980-82.

Gava A. 1991. Intoxicação por *Cestrum corymbosum* var. *hirsutum* in: Riet-Correa F., Schild A., Mendez M.C. (Ed.) Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. Editorial Hemisfério Sul do Brasil. Pelotas, RS. p. 75-78.

Gava A. 1996. Intoxicação por *Cestrum intermedium*. In: Riet-Correa F., Mendez M.C., Schild A.L. (Ed.) Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. Editorial Hemisfério Sul do Brasil. Pelotas, RS. p. 72-74.

Gava A.; Stolf L.; Pilati C.; Neves D.S.; Vigano L. 1991. Intoxicação por *Cestrum corymbosum* var. *hirsutum* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 11: 71-74.

Gava A.; Stolf L.; Varaschin M.S. 1996. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 16:7-20.

Graydon R.; Hamid H.; Zaha R.I.P.; Gardiner C. 1991. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. *Australian Veterinary Journal*, Queensland. 68 (7): 234-236.

Grecco F.B.; Dantas F.A.M.; Riet-Correa F.; Leite C.G.D.; Raposo J. 2002. Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. *Vet. Human Toxicol.* 44: 160-162.

Hadorn, B.; Blum, J.W. 1997. Effects of feeding colostrum, glucose or water on the first day of life on plasma immunoglobulin G concentrations and  $\gamma$ -glutamyltransferase activities in calves. *Journal of Veterinary Medicine*. 44:531-537.

Hooper P.T. 1975. Spongy degeneration in the central nervous system of domestic animals. Part III: Occurrence and pathogenesis of hepatocerebral disease caused by hyperammonaemia. *Acta Neuropathologia (Berlin)* 31: 343- 351.

Hooper P.T.; Best S.M. & Murray D.R. 1974. Hyperammonaemia and spongy degeneration of the brain in sheep affected with hepatic necrosis. *Res. Vet. Sci.* 16: 216-222.

Ilha, M. R. S.; Loretto A.P.; Barros S.S.; Barros C.S.L. 2001. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* Rio de Janeiro. 21 (3): 123-138.

Jerret I.V.; & Chinnock R.J. 1983. Outbreaks of the photosensitization and deaths in cattle due to *Myoporium* af. *Insulare*. *Aust.Vet. J.* 60:183-186.

Kaneko, J.J. Appendixes. 1989. In: Kaneko, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4.ed. San Diego: Academic Press, p.877-901.

Karam F.S.C.; Soares M.P.; Haraguchi M.; Riet-Correa F. Mendez M.C.; Jarenkow J.A. 2004. Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 24(4): 191-198.

Kellerman T.S.; Coetzer J.A.W. & Naudé T.W. 1988. *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*. Oxford University Press, Cape Town. 243p.

Kelly W. R. 1993. The liver and biliary system, 319-404. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 2. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press: San Diego.

Kelly, W. R. 2002. Enfermedad del hígado en grandes y pequeños rumiantes. X Congreso Latinoamericano de Buiatria. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatria. Paysandú-Uruguai, p. 1-6.

Kerr M.G. 1989. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical biochemistry and hematology*. Oxford: Blackwell Scientific.

Kerr M.G. 2003. *Exames laboratoriais em medicina veterinária - Bioquímica clínica e hematologia*. 2º ed. São Paulo: Rocca. p. 154-155.

Kim H.Y.; Stermitz F.R.; Wilson D.W.; Taylor D.; Coulombe R.A. Jr. 1993. Characterization of pyrrolizidine alkaloids-induced DNA-protein cross-link. *Carcinogenesis*. 16: 2691-2697.

- Kramer J.W.; Hoffmann W.E. Clinical enzymology. 1997. In: Kaneko J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic Press, cap. 12. p. 303-25.
- Kramer, J.W. Clinical enzymology. 1989. In: Kaneko, J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. 4.ed. San Diego: Academic Press. p.338-363.
- Láu H.D. 1990. Efeitos tóxicos de *Lantana camara* e de *Pithomyces chartarum* em búfalos. Doc. 54, Embrapa-CPATU, Belém, Pará. 18p.
- Lemos R.A.A.; Ferreira L.C.L.; Silva S.M.; Nakato L. & Salvador S.C. 1996a. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem de *Brachiaria decumbens*. Ciência Rural, Santa Maria, 26:109-113.
- Lemos R.A.A.; Oliveira V.A.; Herrero Júnior. G.O.; Silveira A.C.; Porfírio L.C. 1996b. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bovinos lactentes associada a ingestão de *Brachiaria decumbens*. Abstracts: XV PANVET. Campo Grande-MS, p. 170.
- Lemos R.A.A.; Osório A.L.A.R.; Rangel J.M.R.; Herrero Júnior. G.O. 1996c. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo *Brachiaria brizantha*. Arquivos do instituto biológico. 63 (supl.): 22.
- Lemos R.A.A.; Salvador S.C.; Nakazato L. 1997. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. Veterinary and Human Toxicology, Manhattan. 39 (6): 376-377.
- Lemos R.A.A.; Nakazato L. & Pozo Del C.F. 1998a. Intoxicação por *Brachiaria* sp. p. 299-306. In: Lemos R.A.A. (ed) Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande.
- Lemos R.A.; Purisco L.; Nakazato L.; Bonilha R.; Gattass C.B.A.; Brum K.B. 1998b. Intoxicação experimental por *Enterolobium timbouva* Mart em bovinos. Arquivo Instituto Biológico. 65 (supl.): 109.
- Lemos R.A.A.; Purisco E. 2002. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena In: Lemos R.A.A., Barros N., Brum K.R. (Org.). Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas. Campo Grande: UFMS, 292 p.
- Loretti A.P.; Bezerra P.S.; Ilha M.R.S.; Barros S.S. & Barros C.S.L. 1999. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 19 (2):68-75.
- Luciani S.; Carpenedo F.; Tarjan E.M. 1978. Effects of atractyloside and carboxyatractyloside in the whole animal. In: Santi, R., Luciani S. (ed.), Atractyloside, Piccin Medical Books, Padova, p. 109-124.
- Marzella L.; Trump B.J. 1991. Pathology of the liver: functional and structural alterations of the hepatocyte organelles induced by cell injury. p. 93-138. In: Meeks



R.G., Harrison S.D. & Bull R.J. (ed.) Hepatotoxicology. CRC Press, Boca Raton, Flórida.

Mattocks A.R. 1986. Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. London: Academic Press.

Meagher L.P.; Miles C.O.; Fagliari J.J. 1996. Hepatogenous photosensibilization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. *Vet. Human Toxicol.* 38 (4): 271-274.

Méndez M.C.; Riet-Correa F.; Schild A.L.; Garcia J.T.C. 1985. Intoxicação por *Echium plantagineum* (Boraginaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 5:57-64.

Méndez M.C.; Riet-Correa F.; Schild A.L. 1987. Intoxicação por *Senecio* em spp. em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 7:51-56.

Méndez M.C.; Riet-Correa F. 1993. Intoxication by *Senecio tweediei* in cattle in southern Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 35(1):55.

Méndez M.C.; Driemeier D. 1998. Intoxicação por *Xanthium cavanillesii*. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Mendez M.C. (ed.). Doenças de ruminantes e equinos. Editora e gráfica universitária, Pelotas, RS. p. 498-503.

Meyer D.J.; Coles E. H.; Rich L.J. 1995. Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico. 1º ed. São Paulo: Roca.

Miles C.O.; Munday S.C.; Holland P.T.; Smith B.L.; Embling P.P.; Wilkins, A.L. 1991. Identification of a saponin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *New Zealand Veterinary Journal, Palmerston North.* 39:150-152.

Morais M.G.; Rangel J.M.; Madureira J.S.; Silveira A.C. 2000. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneroladas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootecnia.* 52 (2): 98-104.

Muller G. 2001. Fasciolose. In: Riet-Correa et. al. (Ed.). Doença de Ruminantes e Equinos. São Paulo: Varela. v. 2, cap. 1, p. 118-130.

Nobre D.; Dagle M.L.Z.; Haraguchi M. 1994. *Crotalaria juncea* intoxication in horses. *Veterinary Human Toxicol.* 36: 445-448.

Nobre V.M.T. 2004a. Intoxicação espontânea e experimental em eqüídeos e ruminantes por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) na região semi-árida do Nordeste do Brasil. Tese PhD. Universidade Federal da Paraíba, 115 p.

Nobre V.M.T.; Riet-Correa F.; Dantas A.F.M.; Tabosa I.M.; Medeiros R.M.T. & Barbosa Filho J. M. 2004b. Intoxication by *Crotalaria retusa* in ruminants and eqüidae

in the state of Paraíba, northeastern Brazil, p. 275-278. In: Plant Poisoning and related Toxins. CAB International, Glasgow, UK.

Nobre V.M.T.; Dantas A.F.M.; Riet-Correa F.; Barbosa Filho J.M.; Tabosa I.M.; Vasconcelos J.S. 2005. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*. 45: 347-352.

Odriozola, E.R.; Tapia M.O.; Lopez T.A.; Casaro A.P.; Calandra W. 1987. Intoxicación natural de bovinos com transparente (*Myoporum laetum* Forst.). *Revista de Medicina Veterinária*, 68: 230-232.

Pass M.A. 1977. Tese PhD. University of Queensland.

Pass M.A.; Pollitt S.; Goosem M.W.; Mcsweeney C.S. 1978. The pathogenesis of *Lantana* poisoning. In: Keller R.F., Van Kampen K., James L.F. Poisonous plants: Effects on livestock (Ed.) New York: Academic Press: p. 487-493.

Peek, S.F. et. al. 2001. Hypokalemia, Muscle Weakness and recumbency in Dairy Cattle (17 cases 1991-98). In: Annual Convencion of Bovine Association Practitioners, 34, Vancouver, [Proceedings...].

Peixoto P.V.; Brust L.C.; Duarte M.D.; Franca T.N.; Duarte V.C. 2000. *Cestrum laevigatum* poisoning in goats in Southeastern Brazil. *Vet Human Toxicol*. 42(1):13-14.

Prakash A.S.; Perera, T.N.; Reilly P.E.B. & Seawright A.A. 1999. Pirrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res*. 443: 53-67.

Radostits O. M.; Gay C. C.; Blood D.C. & Hinchcliff K. W. 2002. *Clinica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.347-360, 1737 p.

Raposo J.B.; Driemeier D.; Barros S.S.; Gevehr-Fernandes C. 2003. Evolução das lesões histológicas e ultra-estruturais de ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por *Myoporum laetum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 23 (24): 149-155.

Raposo J.B.; Gevehr-Fernandes C.; Baialardi C.; Driemeier D. 2004. Observações clínicas e bioquímicas de ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por *Myoporum laetum*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32(1): 9-17.

Raposo J.B.; Méndez M.C.; Andrade G.B.; Riet-Correa F. 1998a. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in sheep. *Vet. Human toxicol*. 40: 132-135.

Raposo J.B.; Méndez M.C.; Andrade G.B.; Riet-Correa F. 1998b. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in cattle. *Vet. Human toxicol*. 40: 273-275.

Riedker P.M.; Seitaro O.; Mcdermott W.V.; Trey C.; Huxtable R.J.H. 1985. Hepatic venoocclusive disease associated with the consumption of pyrrolizine-containing dietary supplements. *Gastroenterology*; 88(4): 1050-4.

Riet-Correa F.; Schild A. L. & Méndez M. C. 1986. Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 6(4):111-115.

Riet-Correa F.; Medeiros R.M.T.; Dantas A.F.M. 2006. Plantas tóxicas da Paraíba. Boletim técnico Sebrae-PB, Campina Grande, Paraíba. 54 p.

Riet-Correa F.; Méndez M.C.; Schild A.L.; Riet-Correa I. & Silva Neto S.R. 1984. Intoxicação por *Lantana glutinosa* em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 4:147-153.

Riet-Correa G.; Riet-Correa F.; Schild A.L.; Driemeier D. 2002. Wasting and death in cattle associated with chronic grazing of *Brachiaria decumbens*. *Veterinary and Human Toxicol.* 44: 179-180.

Rozza D.B.; Seitz A.L.; Bandarra P.M.; Santos E.O.; Driemeier D. 2004. Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em búfalo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24 (supl.): 55-56.

Santos R.C. 1997. Intoxicação experimental por *Xanthium strumarium* em bovinos e ovinos. Dissertação de mestrado: Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 32 p.

Santos R.I. 2000. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS e editora da UFSC, p. 323-354.

Scheffer J. F. S.; González F. H. D. 2006. Enzimologia clínica em medicina veterinária. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/index.htm>. Acesso em 04/09/06.

Schild A. L.; Mota A.C.; Riet-Correa F.; Karan F.C.; Grecco F.B. 2006. Photosensitization in cattle in southern Brazil. In: Acamovicc T., Stewart C.S., Pennycott T.W. *Poisonous plants and related toxins*, CAB Publishing, Wallingford pp.162-166.

Seawright A.A.; Lee J.S.; Allen J.G. & Hrdlicka J. 1978. Toxicity of *Myoporum* spp. And their furanosequiterpenoid essential oils., p. 241-250. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. (ed.) *Effects of poisonous plants on livestock*. Academic press. New York.

Seawright A.A.; Kelly W.R.; Hrdlicka J.; McMahon P.; Mattocks A.R.; Jukes R. 1991. Pyrrolizidine Alkaloids in cattle due to Senecio species in Australia. *Vet. Rec.*; 31: 188-189.

Seitz A.L.; Rozza D.B.; Feltrin C.; Traverso S.D.; Colodel E.M.; Driemeier D. 2004. Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 24 (supl.): 67.

Silva F.M. & Couto E.S. 1971. Intoxicação experimental de bovinos pela *Lantana camara* no Estado de Pernambuco. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*. 23:77-89.

Smith B.P. 2006. Medicina Interna de Grandes Animais. 3º Ed. Manole, São Paulo. 1728 p.

Souza R.M., Birgel Júnior E.H., Ayres M.C.C., Birgel E.H. 2004. Influência dos fatores raciais na função hepática de bovinos da raça Holandesa e Jersey. Braz. J. Vet. Res. An. Sci., 41: 306-12.

Sperl W., Stuppner H., Gassner I., Judmaier W., Dietze O., Vogel W. 1995. Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. Eur. J. Pediatr. 154: 112-6.

Tennant B.C. 1997. Hepatic function. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M. Clinical biochemistry of domestic animals. 5<sup>th</sup>. Ed. San Diego: Academic press, cap. 13, p. 327-352.

Tokarnia C.H.; Canella C.F.C.; Döbereiner J. 1960. Intoxicação experimental pela fava da "timbaúba" *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong em bovinos. Arq. Inst. de Biol. An. 3:73-81.

Tokarnia C.H.; Dobereiner J. 1982. Intoxicação de bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. Pesq. Vet. Bras. 2: 143:147.

Tokarnia C.R. & Dobereiner J. 1984a. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (compositae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 4 (2): 39-65.

Tokarnia C.H.; Dobereiner J.; Lazzari A.A.; Peixoto P.V. 1984b. Intoxicação por *Lantana* spp. (Verbenaceae) em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rio de Janeiro. Pesq. Vet. Bras. 4:129-141.

Tokarnia C.H.; Peixoto P.V.; Gava A.; Dobereiner J. 1991. Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 11:25-29.

Tokarnia C.H.; Armien A.G.; Barros S.S.; Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1999. Estudos complementares sobre a toxidez de *Lantana camara* (Verbenaceae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 19(3/4):128-132.

Tokarnia C.H.; Brito M.F.; Driemeier D.; Costa J.B.D.; Camargo A.J.B. 1998. Aborto em vacas na intoxicação experimental por pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 18: 35-38.

Tokarnia C.R.; Dobereiner J. & Peixoto P.V. 2000. Plantas tóxicas do Brasil. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 320 p.

Traverso S.D.; Colodel E.D.; Loretto A.P.; Corrêa A.M.; Driemeier D. 2003. Intoxicação natural por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos. Ciência Rural, Santa Maria, 33 (1): p. 133-136.

Traverso S.D.; Corrêa A.M.R.; Schmitz M.; Colodel M.; Driemeier D. 2004.

Intoxicação por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 24 (4): 211-216.

Traverso S.D.; Corrêa AM.R.; Pescador C.A.; Colodel E.D.; Cruz C.E.F.; Driemeier D. 2002. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 22 (4): 141-147.

Vignais P.V.; Vignais P.M.; Stanislas E. 1962. Action of potassium atractylate phosphorylation in mitochondria and in sub-mitochondrial particles. *Biochimica et Biophysica Acta.* 66: 284-300.

Witte S.T.; Osweiler G.D.; Stahr H.M. & Mobley G. 1990. Cocklebur toxicosis in cattle associated with the consumption of *Xanthium strumarium*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2(4): 263-267.

## **CAPÍTULO II**

### **INTOXICAÇÃO POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS**

**Tradução do trabalho enviado para publicação à revista *Veterinary Pathology*  
como short communication.**

## INTOXICAÇÃO POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS

J. C. A. Santos, F. Riet-Correa, A. F. M. Dantas, S. S. Barros, R. J. Molyneux, R.M. T.  
Medeiros, D. M. da Silva, O. F. de Oliveira

**Autor para correspondência:** Franklin Riet-Correa, Hospital Veterinário, CSTR,  
Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Paraíba, 58700-000,  
Brazil. Email: franklin.riet@pesquisador.cnpq.br, phone: 55-83-34233409, fax: 55-83-  
34213231.

## INTOXICAÇÃO POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS

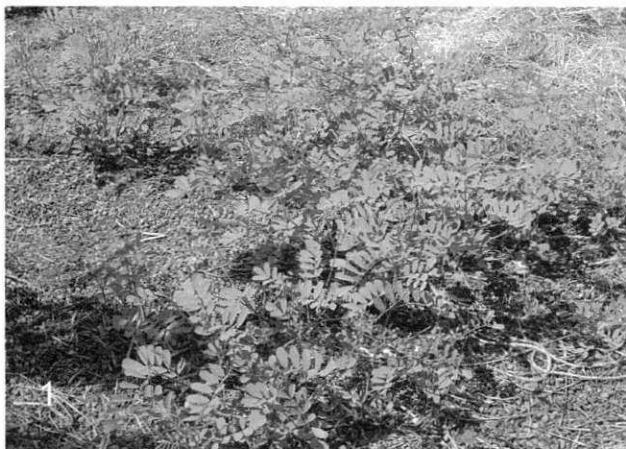
**Resumo.** A doença conhecida como barriga da água é caracterizada por um quadro de ascite progressiva crônica que afeta ovinos que pastam durante a estação seca nas áreas invadidas severamente por *Tephrosia cinerea* na região semi-árida do Nordeste do Brasil. Somente os ovinos que pastam por períodos longos nos pastos onde a planta representa 80%-100% da forragem disponível são afetados. A maioria dos animais morre após um período de manifestações clínicas de algumas semanas ou meses, mas outros se recuperaram após serem retirados dos pastos ou após as primeiras chuvas. Na necropsia, quantidades grandes de líquido são encontradas na cavidade abdominal e o fígado apresenta-se duro e com uma superfície irregular com nódulos pequenos de menos de 1 milímetro. Histologicamente observa-se, no fígado, fibrose periportal com dilatação de veias e vasos linfáticos, espessamento da cápsula de Glisson, proliferação de células epiteliais de ductos biliares, vacuolização dos hepatócitos e moderada estase biliar. Sugere-se que a ascite é devido à hipertensão portal. A doença foi reproduzida experimentalmente em um ovino pela administração de grandes quantidades de *T. cinerea* por 232 dias. Outro ovino recuperado da doença espontaneamente apresentou sinais clínicos após a ingestão de grandes quantidades da planta por 40 dias. As sementes e as folhas da planta foram examinadas por cromatografia de gás e espectrofotometria de massa para a presença de alcalóides pirrolizidínicos com resultados negativos.

**Palavras chaves:** ascite, doença hepática, intoxicação por planta, plantas tóxicas, ovinos, *Tephrosia cinerea*.

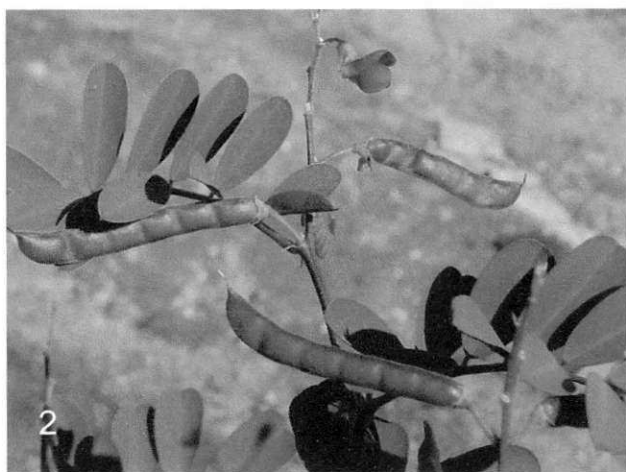
*Tephrosia cinerea* Pers. (Fig 1 e 2) da família Leguminosae-Mimosoideae é um arbusto perene prostrado ou ereto, com ramos róseos ou vermelhos, de 25-75cm de comprimento, e flores púrpuras. As folhas têm 7-13 folíolos. Os frutos são favas curvas ou retas de aproximadamente 7 cm de comprimento, contendo 5-9 sementes.<sup>1,2</sup> É encontrada em todos os estados do Brasil em solos secos e arenosos. Devido a sua resistência à seca é uma planta comum na região semi-árida do Brasil, onde permanece verde durante a maior parte do ano. É uma importante invasora que se torna dominante em áreas onde o solo apresenta pouca cobertura vegetal como resultado de práticas agrícolas erradas, tais como sobre pastoreio e cultivo continuado sem adubação



adequada. É relativamente pouco palatável, mas os ovinos são forçados a ingerir a planta durante períodos secos, quando se torna a única forragem disponível.



**Fig. 1.** *Tephrosia cinerea*. Município de Caicó, Rio Grande do Norte.



**Fig. 2.** *Tephrosia cinerea*. Folhas, Vagens e flores. Município de Caicó, Rio Grande do Norte.

Criadores de regiões pertencentes aos Estados do Rio Grande do Norte e do Ceará, região Nordeste do Brasil, em áreas severamente invadidas pela planta, responsabilizaram a mesma como causa de uma doença em ovinos conhecida como barriga d'água. Os objetivos deste trabalho foram comprovar que a doença é causada pela ingestão de *T. cinerea*, determinar em que condições ocorre esta intoxicação e caracterizar os sinais clínicos e o quadro patológico da mesma.

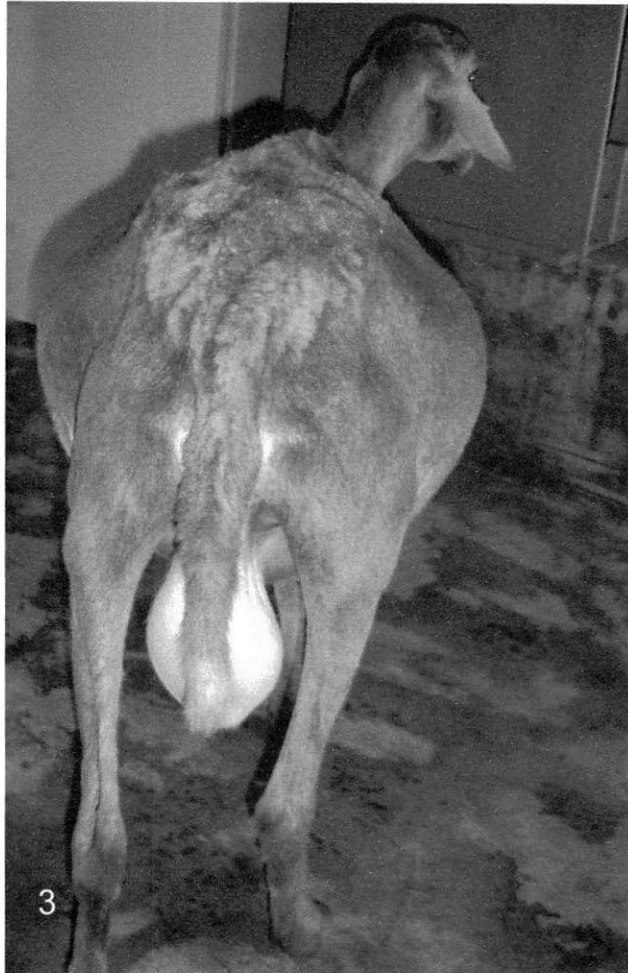


**Fig. 3.** Mapa da região Nordeste do Brasil com destaque para os Municípios dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte onde foram observados casos de intoxicação por *T. cinerea* em ovinos.

As propriedades onde ocorre a doença foram visitadas com o objetivo de se examinar os animais afetados e para inspeção dos pastos. Informações sobre os sinais clínicos e evolução da doença foram obtidas mediante entrevistas com veterinários e proprietários das fazendas de 19 municípios da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte e de um município do Estado do Ceará (Fig. 3). Ambas as áreas localizam-se na região semi-árida da Região Nordeste do Brasil. De um total de 82 proprietários e veterinários entrevistados em 19 municípios localizados na região do Seridó no estado do Rio Grande do Norte, 12 observaram pelo menos 29 surtos de intoxicação por *T. cinerea* em seis municípios (Acari, Cruzeta, Jardim do Seridó, Ouro Branco, Parelhas e São José do Seridó). A doença também foi observada no município de Quixeramobim em uma propriedade (cooperativa) pertencente a 12 criadores. A maioria destes

criadores pararam de criar ovinos em consequência da alta incidência da intoxicação. Grande quantidade de *T. cinerea* representando cerca de 80-100% da forragem disponível foi observada em todas as áreas onde a doença ocorre. Essas áreas tinham sido utilizadas continuamente durante vários anos para o cultivo de feijão, milho ou mandioca, e a invasão pela planta aumentou progressivamente a cada ano. Devido à alta resistência desta planta à seca, geralmente ela se torna a única forragem disponível durante o período seco que se estende de Janeiro-Fevereiro a Maio-Junho, e os ovinos são forçados a pastar nestas áreas e ingerem a planta em grandes quantidades. Caprinos e bovinos oriundos das mesmas áreas não foram afetados. Criadores relataram que estas espécies não ingerem a planta.

Após alguns meses de ingestão da planta a doença se caracterizava por uma ascite progressiva crônica conhecida pelos criadores como barriga d'água. Quando a estação seca avançava, novos casos da doença eram observados afetando ovinos de diferentes faixas etárias, mas geralmente acima de um ano de idade. A morbidade variou de 10% a 70% e letalidade de 50% a 100%. A maioria dos animais se recuperava quando eram retirados das áreas invadidas pela planta e colocados em áreas livres da planta. Novos casos não eram observados nessa situação. Os sinais clínicos eram progressivos com aumento na quantidade de líquido na cavidade abdominal (Fig. 4), anorexia, depressão, dispnéia e intolerância ao exercício.



**Fig. 4.** Ovino intoxicado experimentalmente por *T. cinerea* com aumento de volume abdominal devido à severa ascite.

Dois ovinos procedentes de fazendas onde ocorria a doença foram eutanasiados e necropsiados. O ovino N<sup>o</sup> 1 apresentava sinais característicos da doença. O ovino N<sup>o</sup> 2 havia apresentado sinais clínicos, mas aparentemente tinha se recuperado cerca de 40 dias antes da eutanásia. Amostras de fígado, rins, coração, linfonodos, baço, tireóide, adrenal, rúmex, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado e grosso e músculos esqueléticos foram fixados em formalina neutra tamponada a 10%, embebidas em parafina, seccionadas a 6µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina. O sistema nervoso central foi fixado também em formalina neutra tamponada a 10%. Secções transversais do córtex, núcleos da base, tálamo, mesencéfalo, ponte, cerebelo,

pedúnculos cerebelares, obex e medula espinhal foram avaliados histologicamente. Fragmentos de fígado, rins e baço foram corados pelo vermelho-congo para identificar amiloide.

Na necropsia, o ovino N<sup>o</sup> 1 apresentava severa ascite, com mais de 15 litros de líquido claro ocupando a cavidade abdominal. Hidrotórax e hidropericárdio também foram observados. No ovino N<sup>o</sup> 2 ascite também foi observada, mas a quantidade de líquido era menor do que no ovino N<sup>o</sup> 1. O fígado de ambos os animais apresentava superfície esbranquiçada, irregular (Fig. 5), com presença de pequenos nódulos de até 1 mm. A superfície de corte apresentava uma consistência dura, com áreas de coloração irregular misturadas a áreas de coloração normal. A vesícula biliar estava levemente espessada e com discreto edema na sua parede, havia também dilatação de vasos linfáticos superficiais.

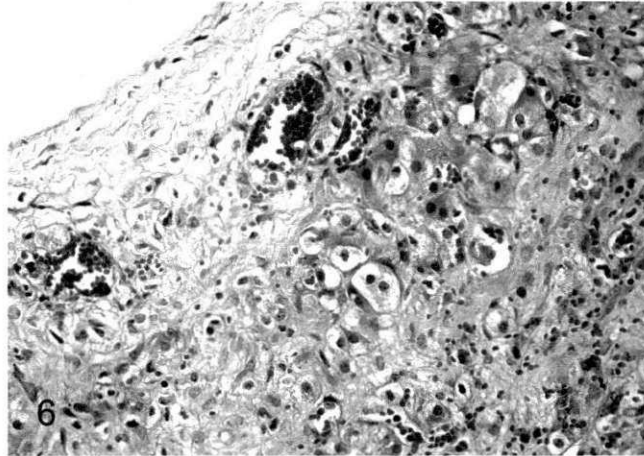


**Fig. 5.** Fígado. Ovino intoxicado naturalmente por *T. cinerea*. A superfície do fígado está muito irregular e com pequenos nódulos.



**Fig. 6.** Fígado. Ovino intoxicado experimentalmente por *T. cinerea*. Fibrose, moderada proliferação de células epiteliais de ductos biliares e dilatação de vasos linfáticos e veias são observados nos espaços porta. HE, x10.

Histologicamente, as lesões nos ovinos N<sup>o</sup> 1 e N<sup>o</sup> 2 foram similares. Proliferação de tecido conjuntivo fibroso foi observada na região periportal (Fig. 6). Em algumas áreas a fibrose se estendia para outras partes do lóbulo ou junto com tecido fibroso de outros espaços portais. Moderada proliferação de células epiteliais de ductos biliares foi observada nos espaços porta, raramente se estendendo para outras regiões do lóbulo. Nas áreas de fibrose e na parede da vesícula biliar vasos linfáticos e veias estavam marcadamente dilatados. Moderada infiltração de células mononucleares foi observada nas regiões periportais. A maioria dos hepatócitos estavam aumentados de tamanho e com vacuolização fina do citoplasma. Essa lesão era mais severa nos hepatócitos da região subcapsular (Fig. 7). Alguns dos hepatócitos da região periportal e região subcapsular estavam necróticos e com marcada eosinofilia citoplasmática. Moderada estase biliar também foi observada. A cápsula de Glisson estava espessada pela proliferação de tecido fibroso com projeções de tecido conectivo dentro do parênquima hepático (Fig. 7) Moderado infiltrado neutrofílico multifocal foi observado no ovino N<sup>o</sup> 2.



**Fig. 7.** Fígado. Ovino intoxicado experimentalmente por *T. cinerea*. A cápsula de Glisson está espessada e o tecido fibroso se estende para o interior do parênquima hepático. Há severa vacuolização e necrose de hepatócitos. HE, x20.

A doença foi reproduzida em dois ovinos. O ovino N<sup>o</sup> 3, da raça Santa Inês, de um ano de idade, pesando 20 kg não ingeriu a planta espontaneamente, desta forma foi fornecida ao animal uma ração comercial para ovinos misturadas com 20% de sementes da planta que foi administrado em quantidades equivalentes a 0,5% do peso vivo. Após uma semana a ração contendo 20% de sementes foi aumentada para uma quantidade equivalente a 1% do peso vivo. Durante o período experimental a planta foi administrada em diferentes concentrações e em diferentes formas (Tabela 1). O animal recebeu, também, feno de *Cynodon dactylon* (Tifton) à vontade, exceto nos últimos 90 dias quando este feno foi substituído por feno de *T. cinerea* contendo folhas, hastes, sementes e flores. Até o final do experimento os ovinos ingeriram a planta durante 322 dias. Foi ingerida uma quantidade equivalente a 47,7 % do peso vivo em sementes, e 63% do peso vivo em vagens e sementes. Além disso, recebeu o feno de *T. cinerea* à vontade durante 90 dias. Considerando uma ingestão do feno entre 0,5% e 1% do peso vivo, o consumo feno de *T. cinerea* pode ser estimado como sendo de 45% a 90% do peso vivo.

**Tabela 1.** Forma de administração de *T. cinerea* ao ovino N<sup>o</sup> 3.

Partes da planta (percentual misturado à ração)	Quantidade de alimento concentrado*	Tipo de feno ( <i>ad libitum</i> )	Período de administração (dias)
Sementes (20%)	0.5% pv	Feno de Tifton	0-7 (7 dias)
Sementes (20%)	1% pv	Feno de Tifton	8-97 (90 dias)
Sementes (30%)	1% pv	Feno de Tifton	98-187 (90 dias)
Vagens com sementes (40%)	1% pv	Feno de Tifton	188-232 (45 dias)
Vagens com sementes (50%)	1% pv	<i>T. cinerea</i> **	143-322 (90 dias)

\* Quantidade de ração com base no peso vivo.

\*\* Feno feito com todas as partes da planta

Outro ovino de raça Santa Inês (N<sup>o</sup> 4), pesando 17 kg, procedente de uma fazenda onde a doença havia ocorrido e que, de acordo com os proprietários, tinha apresentado a doença anteriormente, recebeu a planta por 40 dias. Sementes e vagens misturadas à 50% na ração, a que foi administrada ao animal em uma quantidade equivalente a 1% do peso vivo. Simultaneamente, o animal recebeu feno de *T. cinerea* à vontade. Ambos os ovinos foram eutanasiados e necropsiados no final do experimento.

O ovino N<sup>o</sup> 3 apresentou anorexia, depressão e moderada ascite 2-3 semanas antes do final do experimento que durou 232 dias. O ovino N<sup>o</sup> 4 apresentou anorexia, ascite, dispnéia e intolerância ao exercício, que iniciou 10-20 dias antes da eutanásia, no dia 40. Poucos dias depois do início do experimento, o ovino N<sup>o</sup> 3 apresentou linfadenite purulenta no linfonodo pré-escapular direito. Esta lesão foi drenada cirurgicamente e o animal foi tratado com tetraciclina e se recuperou. Posteriormente à lesão recidivou duas vezes. Em ambas as ocasiões o exsudato purulento foi drenado da lesão, mas o linfonodo permaneceu aumentado de volume, com consistência firme, e às vezes drenando exsudato purulento. *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* foram isoladas da lesão.

Amostras de sangue foram obtidas imediatamente antes da eutanásia nos ovinos N<sup>os</sup> 3 e 4 e enviadas para um laboratório particular (PARA EXAMES, Patos, Paraíba), para determinação da atividade de aspartato-aminotransferase (AST) e gama-glutamiltansferase (GGT), e concentrações séricas de proteínas totais e albumina, de



acordo com os métodos descritos por Schimidt e Von Forstuer.<sup>6</sup> Amostras de dois animais saudáveis foram utilizadas como controle. Os resultados desses exames estão relatados na Tabela 2.

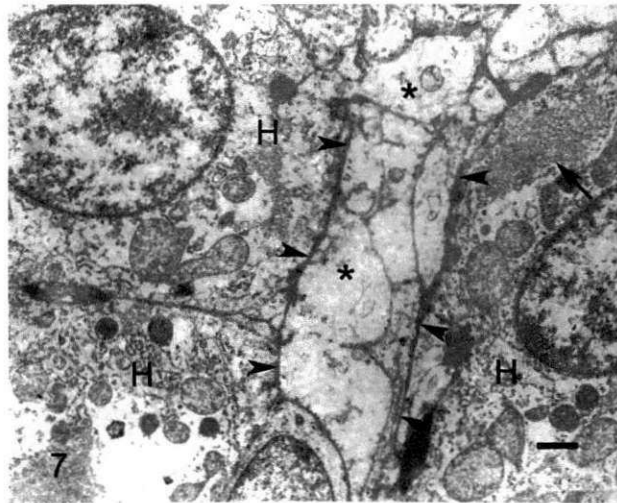
**Tabela 2.** Atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT) e valores de proteínas totais (PT) e Albumina (ALB) nos ovinos N<sup>os</sup> 3 e 4 intoxicados experimentalmente por *T. cinerea* e dois ovinos controle.

Ovinos	AST (U/l)	GGT (U/l)	PT (g/dl)	ALB (g/dl)
Ovino N <sup>o</sup> 3	73	67	8.9	2.2
Ovino N <sup>o</sup> 4	127	153	5.7	1.5
Ovino N <sup>o</sup> 5 (controle)	105	34	7.1	3.4
Ovino N <sup>o</sup> 6 (controle)	129	31	8.4	3.1
Valores normais	60-280	20-52	6-7.9	2.4-3.0

Os ovinos N<sup>os</sup> 3 e 4 apresentaram lesões macroscópicas similares aos casos espontâneos, porém o ovino N<sup>o</sup> 3 apresentou um abscesso fistulado circundado por tecido fibroso no linfonodo pré-escapular direito medindo 6 cm de diâmetro. Lesões histológicas em ambos os animais experimentais foram similares aos casos espontâneos, porém o ovino N<sup>o</sup> 4 apresentou hemorragia mediozonal a centrolobular multifocal. Além disso, no ovino N<sup>o</sup> 4 que ingeriu a planta por 232 dias e apresentou lesão de linfadenite crônica por um longo período também foi observada deposição de substancia hialina homogênea morfológicamente característica de amiloidose depositada entre os hepatócitos. A mesma lesão também foi observada nos rins com deposição extracelular nos glomérulos, e entre os túbulos na região medular. Raramente também foi observado infiltrado de eosinófilos e infiltrado de células mononucleares. Uma substância homogênea eosinofílica foi observada, também, na parede de pequenas artérias no baço. Em todos os tecidos onde essa substancia foi observada a coloração pelo vermelho congo foi fortemente positiva. No ovino N<sup>o</sup> 2 os rins apresentaram moderado infiltrado multifocal de células mononucleares e presença de pigmento pardo no interior de alguns túbulos.

Para microscopia eletrônica, amostras de fígado obtidas dos ovinos N<sup>os</sup> 3 e 4 foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2% com paraformaldeído, em solução tamponada de cacodilato 0,4 molar (pH 7,4), posteriormente fixada em tetróxido de

ósio a 1% em solução tamponada de cacodilato de sódio 0,4 M (pH 7,4) e embebida em Epon 812. Cortes semifinos foram corados com azul de metileno. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 de 80 Kv. Ultra-estruturalmente, severo espessamento de células endoteliais, obstruindo o lúmen sinusoidal com eritrodiapedese para os espaços de Disse foram observadas em ambos os casos experimentais examinados (Fig. 8). Os hepatócitos estavam degenerados e necróticos, com hiperplasia do retículo endoplasmático rugoso associada à presença de grânulos de glicogênio. As mitocôndrias apresentaram matrix granular e mais eletrodensa. Proliferação de fibras de colágeno estava presente nos espaços entre os hepatócitos e nos espaços de Disse. No ovino N<sup>o</sup> 3, grande quantidade de material fibrilar característico de substância amiloide foi observada no interstício.



**Fig. 8.** Microscopia eletrônica. Fígado. Ovino N<sup>o</sup> 4. Sinusóides (cabeça da seta) obstruído pelo inchaço das células endoteliais (asteriscos). Hiperplasia de retículo endoplasmático liso (seta). Hepatócitos (H). Barra = 1 µm.

Amostras de sementes e folhas da planta foram examinadas por cromatografia de gás e espectrofotometria de massa (MS/CG) com o objetivo de detectar alcalóides pirrolizidínicos,<sup>3</sup> apresentando resultados negativos. Embora os alcalóides pirrolizidínicos sejam encontrados comumente em plantas do gênero *Crotalaria*

(Leguminosae), não existem relatos na literatura da ocorrência destes princípios tóxicos nas plantas do gênero *Tephrosia* ou em outras plantas da subfamília Mimosoideae. Aminoácidos não-protéicos, homoarginina e gama-hidroxi-homoarginina, têm sido encontrados em *T. cinerea* e em outras espécies de *Tephrosia*.<sup>2</sup> Estas substâncias não foram encontradas nas amostras de *T. cinerea* neste estudo, provavelmente pelo fato de que a técnica de extração de alcalóides pirrolizidínicos não permite a detecção das mesmas. Contudo, não existem relatos de lesões hepáticas provocadas por estes aminoácidos não-protéicos.

A ocorrência desta doença exclusivamente em áreas onde *T. cinerea* é dominante, e a reprodução experimental da mesma demonstram que a doença é provocada pela ingestão desta planta.

O principal sinal clínico é uma ascite progressiva crônica causada provavelmente pelo aumento da pressão intra-hepática devido à fibrose periportal. A passagem de sangue através do circuito portal pela veia cava caudal é dependente do funcionamento do leito vascular hepático, e a obstrução resulta em refluxo retrógrado de sangue pelo sistema porta, resultando em hipertensão portal e ascite.<sup>5</sup> Por outro lado, apesar dos relativos baixos níveis de albumina encontrados nos dois animais experimentais, a ausência de edema subcutâneo localizado nas partes baixas do corpo sugere que a ascite não ocorre devido à hipoproteinemia. Na obstrução da circulação portal pela fibrose hepática, o edema é mais severo e mais confinado a cavidade abdominal<sup>5</sup>. A fibrose da cápsula de Glisson que se infiltra dentro do parênquima hepático, devida provavelmente à perda de hepatócitos, é responsável pelo aspecto nodular da superfície do fígado observada na necropsia. A amiloidose observada no ovino N<sup>o</sup> 3 ocorreu provavelmente devido a linfadenite caseosa crônica localizada no linfonodo pré-escapular direito.

A respeito das semelhanças entre esta doença e a intoxicação pelos alcalóides pirrolizidínicos, os resultados de análise química de amostras da planta excluem a possibilidade da doença ter sido provocada por estas substâncias.

É necessária a ingestão de grandes quantidades de plantas para ocorrer a intoxicação. De acordo com informações de campo a intoxicação ocorre somente em áreas onde a planta é dominante e após longos períodos de ingestão da planta. Estas condições ocorrem na região semi-árida do Brasil durante o longo período de seca. No Brasil, a região semi-árida possui uma extensão de aproximadamente um milhão de km<sup>2</sup> e *T. cinerea* é encontrada em toda a região. Como *T. cinerea* invade áreas degradadas

submetidas à agricultura intensiva, que se torna dominante em poucos anos, é importante controlar a planta imediatamente após a sua detecção nos pastos. A única medida de controle da intoxicação nas áreas invadidas pela planta é a retirada dos rebanhos das áreas severamente invadidas pela *T. cinerea* imediatamente depois da observação dos primeiros sinais clínicos.

#### Referências

1. Bentham G: Leguminosae. I. Papilionaceae. In: Martius CFP von. Flora Brasiliensis. Lipsiae: Fridr. Fleicher, v. 15, pt. 1, p. 48, 1859-1862
2. Evans SV, Fellows LE, Bell EA: Distribution and systematic significance of basic non-protein amino acids and amines in the Tephrosieae. *Bioch Syst Ecol* 13:271-302, 1985
3. Gardner DR, Thorne MS, Molyneux RJ, Pfister JA, Seawright AA: Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. *Bioch Syst Ecol* 34:736-744, 2006
4. Pio Corrêa M: Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol 1, p.130, 1926
5. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW: *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats & Horses*. 9<sup>th</sup> ed., London, WB Saunders, p.347-360, 1999
6. Schmid M, von Forstner M: *Laboratory testing in veterinary medicine. Diagnosis and clinical monitoring*. Bohringer Mannheim, Manheim, 1986 .

## **ANEXO**

## INTOXICATION By *Tephrosia cinerea* IN SHEEP

J. C. A. Santos, F. Riet-Correa, A. F. M. Dantas, S. S. Barros, R. J. Molyneux, R.M. T.  
Medeiros, D. M. da Silva, O. F. de Oliveira

**Short title: Intoxication by *Tephrosia cinerea***

**Corresponding author:** Franklin Riet-Correa, Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Paraíba, 58700-000, Brazil. Email: franklin.riet@pesquisador.cnpq.br, phone: 55-83-34233409, fax: 55-83-34213231

**Intoxication by *Tephrosia cinerea* in sheep**

J. C. A. Santos, F. Riet-Correa, A. F. M. Dantas, S. S. Barros, R. J. Molyneux, R.M. T.  
Medeiros, D. M. da Silva, O. F. de Oliveira

**Abstract.** A disease known as water belly (barriga d' água) characterized by chronic progressive ascites affects sheep grazing during the dry season in areas severely invaded by *Tephrosia cinerea* in the semiarid region of northeastern Brazil. Only sheep grazing for long periods in pastures where the plant represents 80%-100% of the available forage are affected. Most animals died after a clinical manifestation period of some weeks or months, but others recovered when they were withdrawn from the pastures or after the first rains. At necropsy, large amounts of liquid were found in the abdominal cavity and the liver was hard with an irregular surface with small nodules of less than 1 mm. Histologically, liver lesions were periportal fibrosis with dilated veins and lymphatic vessels, thickening of the Glisson capsule, bile duct proliferation, vacuolation and occasionally individual necrosis of hepatocytes, and mild bile stasis. It is suggested that ascites is due to portal hypertension. The disease was produced experimentally in one sheep by the administration of large amounts of *T. cinerea* for 232 days. Another sheep, recovered from the spontaneous disease, had clinical signs after the ingestion of large amounts of the plant for 40 days. Seeds and leaves of the plant were examined by gas chromatography/mass spectrometry for the presence of pyrrolizidine alkaloids with negative results.

**Key words:** ascites; liver disease; plant intoxications; toxic plants; sheep; *Tephrosia cinerea*.

*Tephrosia cinerea* Pers. (Fig. 1 and 2) belongs to the family Leguminosae, subfamily Faboideae is an undershrub of variable aspect (prostrate, decumbent or erect), up to 60 cm tall, and ramose; the stem, branches and leaves are usually with gray hairs; the leaves are odd-pinnate with 7-13 linear-oblong leaflets; flowers are disposed in fascicles, violaceous to slightly purple, 12-15mm long; legumes are straight to slightly arcuate, 3.5-5.0cm long and 4-5mm wide, covered with short appressed hairs, and containing 5-9 seeds<sup>1,4</sup>. It is found in all Brazilian states in dry and sandy soils. Because of its resistance to drought it is a particularly common weed in the Brazilian semiarid region where it stays green for the majority of the year. It is a troublesome weed and becomes particularly numerous where the soil has been denuded of grass as a result of bad farming practices such as continuous cultivation and/or overgrazing. It is relatively

unpalatable, but sheep are forced to graze the plant during dry periods when it becomes the only available forage.

Farmers from the states of Rio Grande do Norte and Ceará, northeastern Brazil, in areas severely invaded by *T. cinerea* claimed that the ingestion of this plant causes a disease of sheep known as "barriga d'água (water belly). The objectives of this investigation were to demonstrate that the disease is caused by the ingestion of *T. cinerea*, to determine the conditions under which the intoxication occurs, and to characterize the clinical signs and pathology of the intoxication.

Farms where the disease occurs were visited to examine affected animals and for inspection of the pastures. Information of clinical signs and evolution of the disease were obtained from veterinarians and farmers in 19 municipalities in the Seridó region, state of Rio Grande do Norte and one municipality in the state of Ceará. Both regions are in the semiarid area of Northeastern Brazil. From 82 farmers or veterinarians interviewed in 19 municipalities in the Seridó region of Rio Grande do Norte state, 12 observed at least 29 outbreaks of intoxication by *T. cinerea* in six municipalities (Acari, Cruzeta, Jardim do Seridó, Ouro Branco, Parelhas and São José do Seridó). The disease was also observed in the Municipality of Quixeramobim in a farm association with 12 farmers. Most of those farmers stopped producing sheep because of the high incidence of the intoxication. Large amounts of *T. cinerea* representing 80-100% of the vegetation were observed in all paddocks where the disease occurred. The paddocks had been used continually for many years to cultivate beans, corn or cassava, and the invasion of the paddocks by the plant increased continuously. Because the plant is extremely resistant to drought, generally it becomes the only available forage during the dry period which extends from May-June to January-February, and sheep are forced to browse it in large amounts. Goats and cattle were not affected, and farmers reported that these species do not ingest the plant.

After some months of ingestion sheep present a disease characterized by chronic progressive ascites, called "barriga d'água" (water-belly) by the farmers. When the dry season is advancing new cases of the disease are observed affecting sheep of different ages, but generally older than one year. Morbidity rate varies from 10% to 70%, and the fatality rate is 50% to 100%. If the flock is withdrawn to other areas without the plant, at the start of clinical signs, most affected sheep recovered and new cases are not



observed. Clinical signs are progressive with increasing amount of liquid in the abdominal cavity (Fig. 3), anorexia, depression, dyspnoea and intolerance to exercise.

Two sheep from two affected farms were euthanized and necropsied. Sheep No 1 had characteristic clinical signs of the disease. Sheep No 2 has had clinical signs, but was apparently recovered nearly 40 days before euthanasia. Samples of liver, kidney, heart, lymph nodes, spleen, thyroid, adrenal, rumen, reticulum, omasum, abomasum, small and large gut, and skeletal muscles were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin and sectioned at 6  $\mu$ m and stained by haematoxylin-eosin. The whole central nervous system was also fixed in 10% neutral formalin and transverse sections of the cortex, basal nuclei, thalamus, mesencephalus, pons, cerebellum, cerebellar peduncles, medulla and spinal cord were studied histologically. Sections of the liver were stained by Masson trichromic for fibrous tissue, and sections of liver, kidney and spleen were stained by congo red for amyloid.

At necropsy, Sheep No 1 had severe ascites, with more than 15 l of clear liquid in the abdominal cavity. Hydrothorax and hydropericardium were also observed. Sheep No 2 had also ascites, but with less amount of liquid than Sheep No 1. The liver of both sheep had a whitish irregular nodular surface (Fig. 4) with presence of small nodules, up to 1 mm. The cut surface of the liver had a hard consistency and an irregular colored cut surface with whitish areas mixed with normal colored areas. The gallbladder was slightly enlarged with discrete edema in the wall and dilated lymphatic vessels in the surface.

Histologically, lesions in Sheep No 1 and 2 were similar. Proliferation of fibrous tissue was observed in the periportal area (Fig. 5). Sometimes the fibrosis extended to other parts of the lobe or joined with fibrous tissue from other periportal spaces. Moderate proliferation of bile duct cells was observed in the portal triads, rarely extending to other regions of the lobe. In the areas of fibrosis and in the wall of the gall bladder lymphatic vessels and veins were markedly dilated. Mild infiltration of mononuclear cells was observed in the periportal areas. Most hepatocytes were enlarged with fine vacuolation of the cytoplasm. This lesion was more severe in the subcapsular hepatocytes (Fig. 6). Some hepatocytes of the periportal and subcapsular areas had individual necrosis with marked eosinophilic cytoplasm. Mild bile stasis was also observed. The Glisson capsule was thickened by proliferation of connective tissue with projections of connective tissue into the liver parenchyma (Fig. 6). Mild multifocal accumulation of neutrophils was observed in Sheep No 2.

The disease was produced in two experimental sheep. Sheep No 3, was a one year old, Santa Inês crossbred hair sheep weighting 20 kg. Because it did not ingest the plant spontaneously, initially ground seeds of the plant were mixed at 20% in a commercial ground sheep ration, which was given in an amount equivalent to 0.5% body weight. After one week the amount of ration containing 20% of seeds was increased to 1% body weight. During the experimental period the plant was administered in different concentrations and in different forms (Table 1). The animal also received *Cynodon dactylon* (Tifton grass) hay *ad libitum*, except for the last 90 days when this hay was substituted by a hay of *T. cinerea* dried in the shade containing leaves, stems, seeds, and flowers of the plant. At the end of the experiment the sheep had ingested the plant during 232 days. It ingested an amount equivalent to 47.7% of live weight of seeds, and 63% of live weight of pods with seeds. It also received hay of *T. cinerea ad libitum* during 90 days. Considering an ingestion of hay between 0.5% and 1% body weight, the consumption of *T. cinerea* hay can be estimated as 45% to 90% of the live weight.

Another crossbred Santa Inês hair sheep (No 4), weighting 17 kg from a farm where the disease occurred and that the farmer said it had presented the disease before, received the plant for 40 days. Seeds and pods of the plant were mixed at 50% in a concentrate commercial ration, which was given in an amount equivalent to 1% of its live weight. Simultaneously it received *T. cinerea* hay *ad libitum*. Both sheep were euthanized and necropsied at the end of the experiment.

Experimental sheep No 3 had anorexia, depression and mild ascites 2-3 weeks before the end of the experiment on day 232. Experimental sheep No 4 had anorexia, ascites, dyspnoea and exercise intolerance, starting 10-20 days before euthanasia. A few days after the start of the experiment, Sheep 3 had a purulent lymphadenitis in the right prescapular lymph node. This lesion was surgically drained and the animal was treated with tetracycline and recovered. Later the lesion relapsed twice, draining purulent exudates from the lesion. Both times the sheep was treated in the same way as before, but the lymph node stayed enlarged, with hard consistency, sometimes draining purulent exudates. *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* were isolated from the lesion.

Blood samples obtained immediately before euthanasia in Sheep No 3 and 4 were sent to a private laboratory (PARA EXAMES, Patos, Paraíba) for the determination of serum activity of aspartate-aminotransferase (AST) and gamma-

glutamyltransferase (GGT), and serum concentrations of total proteins and albumin, with the methods reported by Schmid and von Forstner.<sup>6</sup> Samples from two normal sheep (Nos 5 and 6) were used as controls. Results of those examinations are presented in Table 2.

Experimental sheep Nos 3 and 4 had similar gross lesions to spontaneous cases, but Sheep No 3 had a chronic fistulated abscess surrounded by fibrous tissue in the right prescapular lymph node measuring 6 cm in diameter. Histologic lesions in both experimental sheep were similar to spontaneous cases, but Sheep No 4 had multifocal centrilobular or midzonal hemorrhages. Additionally, in Sheep No 3, that ingested the plant for 232 days and had a chronic lymphadenitis lesion for a long period, an eosinophilic homogeneous hyaline substance with morphologic characteristics of amyloid was deposited between hepatocytes. A similar substance was observed in the kidney deposited extracellularly in glomeruli, and between tubules in the medullar region. Rare eosinophilic casts and some interstitial infiltration of mononuclear cells were also observed. An eosinophilic homogeneous substance was also observed in the wall of the small arteries of the spleen. In all these tissues the substance was strongly positive to Congo red.

For electron microscopy, samples of the liver from sheep Nos 3 and 4 were fixed in 2% glutaraldehyde with 2% paraformaldehyde, in 0.4 M cacodylate buffer (pH 7.4), post fixed in 1% osmium tetroxide buffered in 0.4 M sodium cacodylate (pH 7.4), and embedded in Epon 812. Semithin sections were stained with methylene blue. Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined with an EM 109 Zeiss transmission electron microscope at 80 Kv. Ultrastructurally, severe swelling of the sinusoidal endothelial cells, obstructing the sinusoidal lumen (Fig. 7) with erythrodiapedesis to the Disse space was observed on both sheep examined. The hepatocytes were degenerated or necrotic with conspicuous hyperplasia of the smooth endoplasmic reticulum associated with glycogen granules. The mitochondria have a granular more eletrodense matrix. Proliferation of collagen fibers was present in the space between hepatocytes and in the Disse space. In Sheep No 3, large amounts of fibrillar material characteristic of amyloid were observed in the interstitium.

Samples of seeds and leaves of the plant were examined by gas chromatography/mass spectrometry for the presence of pyrrolizidine alkaloids<sup>3</sup> with negative results.

The occurrence of the disease exclusively in paddocks where *T. cinerea* is dominant, and the experimental production of the intoxication demonstrated that it is caused by the ingestion of that plant.

The main clinical sign is chronic progressive ascites caused probably by increased intrahepatic pressure due to the periportal fibrosis. The passage of blood from the portal circuit through to the caudal vena cava is dependant upon the patency of the hepatic vascular bed, and obstruction result in damming back of blood in the portal system, portal hypertension and ascites.<sup>5</sup> Despite the relative low levels of albumin in the two experimental sheep, the absence of subcutaneous dependent edema in the lower parts of the body suggest that ascites is not due to hypoproteinemia. In obstruction of the portal circulation by hepatic fibrosis the edema is much more severe but it is largely limited to the abdominal cavity.<sup>5</sup> Fibrosis of the Glisson capsule extending into the hepatic parenchyma, due probably to loss of hepatocytes, was responsibly for the nodular aspect of the liver surface on necropsy. The amyloidosis observed in Sheep No 3 was probably due to the chronic caseous lymphadenitis of the right prescapular lymph node.

Despite some similarities between this disease and the intoxication by pyrrolizidine alkaloids, results of the chemical analysis excluded the possibility of the disease being caused by those substances. Although pyrrolizidine alkaloids are common in the genus *Crotalaria* (Leguminosae) there are no literature reports of their occurrence in the genus *Tephrosia* or the sub-family Mimosoideae. The non-protein amino acids, homoarginine and gamma-hydroxyhomoarginine, which have been reported to occur in *T. cinerea* and many other *Tephrosia* species<sup>2</sup> were also not found, probably because they would not be detected under the extraction procedure and GC/MS conditions used for pyrrolizidine alkaloids. However, there are no reports of these non-protein amino acids causing liver damage.

The high amount of the plant necessary to cause the disease agrees with the field information that intoxication only occurs in areas where the plant is dominant and after a long period of grazing. These conditions occur in the Brazilian semiarid areas during the long dry periods. The Brazilian semiarid region has an extension of nearly one million km<sup>2</sup> and *T. cinerea* is found in almost the whole area, and proliferates in degraded areas submitted to intensive agriculture where it becomes dominant after a few years. To prevent the intoxication it is important to control the plant immediately after its detection in the paddocks, because when it becomes dominant in the pasture its

control is very difficult. The only way to control the intoxication in areas invaded by the plant is to withdraw the flock from the areas infested by *T. cinerea* immediately after the observation of the first clinical signs.

#### Aknowledgements

This work was financially supported by the Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), grant N° 001/04, CNPq, FAPESQ, MCT, and by Institutos do Milênio, grant N° 420012/2005-2)the National Council of Scientific and Technologic Development (CNPq).

#### References

7. Bentham G: Leguminosae. I. Papilionaceae. In: Martius CFP von. Flora Brasiliensis. Lipsiae: Fridr. Fleicher, v. 15, pt. 1, p. 48, 1859-1862
8. Evans SV, Fellows LE, Bell EA: Distribution and systematic significance of basic non-protein amino acids and amines in the Tephrosieae. Bioch Syst Ecol **13**:271-302, 1985
9. Gardner DR, Thorne MS, Molyneux RJ, Pfister JA, Seawright AA: Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. Bioch Syst Ecol **34**:736-744, 2006
10. Pio Corrêa M: Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol 1, p.130, 1926
11. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW: Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats & Horses. 9<sup>th</sup> ed., London, WB Saunders, p.347-360, 1999
12. Schmid M, von Forstner M: Laboratory testing in veterinary medicine. Diagnosis and clinical monitoring. Bohringer Mannheim, Manheim, 1986 .

Table 1. Form and time of administration of *T. cinerea* in Sheep No 3.

Parts of the plant (amount mixed in food)*	Amount of concentrate food	Kind of hay ( <i>ad libitum</i> )	Administration period (days)
Seeds (20%)	0.5% bw**	Tifton grass	0-7 (7 days)
Seeds (20%)	1% bw	Tifton grass	8-97 (90 days)
Seeds (30%)	1% bw	Tifton grass	98-187 (90 days)
Pods with seeds (40%)	1% bw	Tifton grass	188-232 (45 days)
Pods with seeds (50%)	1% bw	<i>T. cinerea</i> ***	143-232 (90 days)

\* Percentage mixed in the concentrate ration. \*\* Amount in percentage of live weight.

\*\*\* Hay made with the whole aerial plant including seeds.

Table 2. Serum activity of aspartate-aminotransferase (AST) and Gama-gutamyltransferase (GGT), and values of total protein (TP) and albumin (AL) in Sheep Nos 3 and 4 intoxicated experimentally by *T. cinerea* and two control sheep.

Sheep No	AST (U/l)	GGT (U/l)	PT (g/dl)	ALB (g/dl)
Sheep 3	73	67	8.9	2.2
Sheep 4	127	153	5.7	1.5
Sheep 5 (control)	105	34	7.1	3.4
Sheep 6 (control)	129	31	8.4	3.1
Normal values	60-280	20-52	6-7.9	2.4-3.0

## Figure legends.

**Fig. 1.** *Tephrosia cinerea*. Municipality of Caicó, Rio Grande do Norte.

**Fig. 2.** *Tephrosia cinerea*. Leaves, pods and flowers in the Municipality of Caicó, Rio Grande do Norte.

**Fig. 3.** Sheep intoxicated by *T. cinerea* with abdominal enlargement due to severe ascitis.

**Fig. 4.** Sheep intoxicated by *T. cinerea* with large amounts of liquid in the abdominal cavity.

**Fig. 5.** Liver. Sheep intoxicated by *T. cinerea*. The liver surface is very irregular with small nodules.

**Fig. 6.** Liver. Sheep intoxicated by *T. cinerea*. Fibrosis, mild proliferation of bile duct cells and dilated lymphatic vessels and veins are observed in the portal triads.

**Fig. 7.** Liver. Sheep intoxicated by *T. cinerea*. The Glisson capsule is thickened and fibrous tissue is extending within liver parenchyma. Severe vacuolated hepatocytes are also observed.

**Fig. 8.** Electron microscopy micrograph. Liver. Sheep No 4. Sinusoid (arrowheads) obstructed by swollen profiles of endothelial cells (asterisk). Hyperplasia of the smooth endoplasmic reticulum (arrow). Hepatocytes (H). Bar = 1  $\mu$ m.