

Intoxicação experimental por folhas de *Crotalaria pallida* (*mucronata*) em ovinos¹

Vanessa Borelli^{2*}, Thalita C. Cardoso², Claudia P. Biffi², Nathalia Wicpolt², Daiane Ogliari², Thaisa Savari², Sandra D. Traverso² e Aldo Gava²

ABSTRACT.- Borelli V., Cardoso T.C., Biffi C.P., Wicpolt N., Ogliari D., Savari T., Traverso S.D. & Gava A. 2016. [Experimental poisoning by *Crotalaria pallida* (*mucronata*) in sheep.] Intoxicação experimental por folhas de *Crotalaria pallida* (*mucronata*) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(10):935-938. Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luiz de Camões 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, SC 88520-000, Brazil. E-mail: a2ag@cav.udesc.br

This paper describes the toxic potential of the green leaves of *Crotalaria pallida* and the clinical signs in experimentally poisoned sheep. Green leaves of *C. pallida* were collected in São João do Sul, Santa Catarina, and administered orally to six adult sheep, as single dose of 40, 20, 10, 5, 2.5 and 2.5g/kg, and for two sheep at doses of 0.63 and 1.25g/kg during 30 days. The poisoning was reproduced at lethal doses of 2.5g/kg. One of the sheep that received a single dose of 2.5g/kg and another that received daily doses did become ill. All sheep which developed clinical signs died between 13 and 22 hours after administration of the plant. Slight signs started in about 11 hours after ingestion of the plant, and clinical signs included loose stool, restlessness and increased heart and respiratory rates. A few minutes preceding death, pronounced abdominal breathing and severe dyspnea was observed. The main gross lesions were restricted to the thoracic cavity, as severe pulmonary edema and hydrothorax. Lung microscopy showed marked edema in the diffuse pleural surface, the interlobular spaces and around the peribronchial arteries. Multifocal edema was observed within alveoli and around the bronchi and bronchioles, and mild multifocal infiltration of neutrophils. The clinical and pathological alterations of the experimental poisoning was similar to that observed in the spontaneous poisoning, characterized by marked pulmonary edema and death shortly after the onset of clinical signs.

INDEX TERMS: Poisonous plants, animal pathology, *Crotalaria mucronata*, plant poisoning, sheep.

RESUMO.- Descrevem-se o quadro clínico, patológico e o potencial tóxico das folhas verdes de *Crotalaria pallida* em ovinos. Para o experimento folhas verdes de *C. pallida* foram coletadas no município de São João do Sul em Santa Catarina e administradas por via oral para seis ovinos adultos, em doses únicas de 40, 20, 10, 5, 2,5 e 2,5g/kg, e para dois ovinos, em doses diárias de 0,63 e 1,25g/kg durante 30 dias. Reproduziu-se a intoxicação com doses letais a

partir de 2,5g/kg. Um dos ovinos que recebeu a dose única de 2,5g/kg e os que receberam as doses diárias, não adoeceram. Todos os ovinos que apresentaram sinais clínicos morreram entre 13 e 22 horas após a administração das folhas. Sinais clínicos leves como fezes pastosas, inquietação e aumento das frequências cardíaca e respiratória tiveram início cerca em 11 horas após a ingestão da planta. Minutos antes da morte observaram-se dispneia intensa com respiração abdominal pronunciada. As principais lesões macroscópicas foram restritas à cavidade torácica, como hidrotórax e edema pulmonar acentuado. O exame microscópico revelou no pulmão, edema acentuado e difuso na superfície pleural, nos espaços interlobulares e ao redor das artérias peribronquiais e peribronquiolares. Edema multifocal foi observado no interior de alvéolos e ao redor de brônquios e bronquíolos, além de leve infiltrado neutro-

¹ Recebido em 25 de fevereiro de 2016.

Aceito para publicação em 3 de julho de 2016.

Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, concluída no ano de 2015 na Universidade do Estado de Santa Catarina.

² Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Av. Luiz de Camões 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, SC 88520-000, Brasil. *Autor para correspondência: a2ag@cav.udesc.br

fílico multifocal. O quadro clínico-patológico da intoxicação experimental foi similar ao observado na intoxicação espontânea e caracterizou-se por edema iulmonar acentuado e morte logo após o início dos sinais clínicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, patologia animal, *Crotalaria mucronata*, intoxicação por plantas, ovinos.

INTRODUÇÃO

Na região do litoral sul do Estado de Santa Catarina diagnosticou-se um surto com alta mortalidade em ovinos, que ocorreu entre os meses de janeiro e fevereiro de 2012, após os animais permanecerem em uma área com grande quantidade de *Crotalaria pallida*. De um total de 186 ovinos adultos da raça Texel, 23 morreram sendo 12 em um único dia, logo após a roçada da *Crotalaria* que existia em grande quantidade junto ao pasto. Os animais foram encontrados mortos sem evidência de sinais clínicos pelo produtor. Na macroscopia observaram-se hidrotórax, edema pulmonar acentuado na superfície pleural e grande quantidade de espuma no interior de brônquios e traquéia. A doença foi reproduzida através da administração de folhas verdes de *C. pallida* para um ovino adulto em dose única de 40g/kg (Borelli et al. 2015).

No Brasil, há relato de intoxicação espontânea por *Crotalaria pallida* em bovinos, no estado de Minas Gerais. Neste surto morreram 12 animais após receberem ração contaminada com sementes de *Crotalaria* que adicionalmente ingeriram a planta no quintal de uma casa abandonada (Lemos et al. 1997). O período de evolução foi de 15 a 30 dias. Na necropsia havia lesões pulmonares e hepáticas. O exame microscópico revelou, nos pulmões espessamento difuso das paredes alveolares devido à proliferação dos pneumócitos tipo II e de fibroblastos. Em apenas um bovino foram observadas lesões hepáticas caracterizadas por necrose centro-lobular e moderada fibrose periportal (Lemos et al. 1997).

Experimentalmente para esta mesma espécie, folhas verdes de *C. pallida* causaram intoxicação nas doses únicas de 60 e de 80g/kg. Os sinais clínicos mais evidentes foram tremores musculares e na necropsia apenas um bovino que morreu com a dose de 25g/kg, apresentou hidrotórax e edema pulmonar acentuados. Os animais morreram entre 16 e 68 horas após a administração da planta (Tokarnia & Döbereiner 1982).

Em outro estudo, sementes moídas de *C. pallida*, foram administradas para bovinos em doses diárias de 5, 7,5 e 10g/kg durante 47 a 61 dias. Os animais apresentaram sinais clínicos entre 47 e 80 dias após o início da administração e morte entre 3 horas e 5 dias após o início da sitomatologia. Os principais sinais foram pulso venoso positivo da veia jugular, respiração abdominal, taquicardia, fezes ressequidas, edema submandibular e fraqueza. Os achados de necropsia foram palidez pulmonar, hidropercárdio, hidrotórax, hidropéritoônio, edema de mesentério, aumento da consistência hepática, dilatação de ventrículo direito e edema da parede ruminal. O exame histológico revelou, no pulmão, espessamento das paredes alveolares e da parede das arteríolas, com diminuição da luz e fibrose periarteriolar (Boghossian et al. 2007).

Os objetivos deste estudo foram determinar através de experimentos a dose tóxica, possível efeito acumulativo e caracterizar os achados clínico-patológicos da intoxicação por *C. pallida* em ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Patologia Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina. Para a experimentação foram colhidas folhas verdes de *Crotalaria pallida* (Fig.1), na propriedade onde ocorreu o surto. As folhas foram mantidas em câmara fria e posteriormente administradas por via oral em dose única de 40, 20, 10, 5, 2,5 e 2,5g/kg, para seis ovinos adultos; para dois outros ovinos foram administradas doses diárias de 0,63 e 1,25g/kg durante 30 dias. Os ovinos eram provenientes de propriedade livre de *C. pallida*. Durante o experimento os ovinos foram mantidos em baias de alvenaria e alimentados com capim quicuío (*Pennisetum clandestinum*), azevém (*Lolium multiflorum*) e água *ad libitum*. Os animais foram pesados e submetidos a exames clínicos antes e repetidas vezes após a administração da planta, sendo avaliados a frequência respiratória e cardíaca, movimentos ruminais, temperatura retal, além do comportamento. Os ovinos que morreram foram necropsiados e amostras de tecidos de pulmão, coração, rumem, omaso, abomaso, intestino, fígado, rim, baço, linfonodo e sistema nervoso central foram colhidas e fixadas em formalina a 10%, para exame histológico. O material foi processado rotineiramente, corado pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) (Prophet et al. 1992) e avaliado em microscópio óptico. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética de Experimentação animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UEDESC) sob o Protocolo 1.13.12 em 2012.



Fig.1. *Crotalaria pallida* no Município de São João do Sul, SC.

RESULTADOS

Na intoxicação experimental, os Ovinos 1, 2, 3, 4 e 6 morreram entre 13 e 22 horas após a administração da planta. Nestes animais os sinais clínicos foram semelhantes e iniciavam com inquietação; os animais deitavam e levantavam várias vezes. Observaram-se fezes pastosas, diminuição do apetite, respiração abdominal e aumento das frequências cardíaca e respiratória. Minutos antes da morte, a respiração abdominal tornava-se pronunciada com dispnéia, caracterizada por movimentação acentuada das narinas e

Quadro 1. Resultados da intoxicação experimental por *Crotalaria pallida* em ovinos

Ovino	Peso animal (kg)	Dose (g/kg) / nº administrações	Início dos sinais clínicos (h)	Morte após administração da planta (h)
1	53	40/1	12	15
2	33	20/1	14	17
3	48	10/1	11	13
4	53	5/1	17	18
5	55	2,5/1	Não adoeceu	--
6	52	2,5/1	21	22
7	48	1,25/30	Não adoeceu	--
8	55	0,63/30	Não adoeceu	--

abertura da boca na tentativa de respirar. Todos os animais que adoeceram morreram em aproximadamente 10 minutos após o início da dispnéia. O delineamento experimental está representado no Quadro 1.

Macroscopicamente as mucosas estavam cianóticas, havia hidrotórax com aproximadamente um litro de líquido translúcido, hidropericardio, pulmão volumoso não colabado, pesado e brilhante com edema acentuado de consistência gelatinosa, subpleural (Fig.2), interlobular e ao redor das artérias. A coloração do pulmão variou entre pálida ou com áreas vermelho-escuras. Na traqueia e brônquios havia grande quantidade de espuma. O exame microscópico revelou no pulmão, edema acentuado e difuso na superfície pleural (Fig.3A), nos espaços interlobulares e ao redor das artérias peribronquiais e peribronquiolares (Fig.3B). Edema multifocal foi verificado no interior de alvéolos e ao redor de brônquios e bronquíolos, além de leve infiltrado inflamatório neutrofilico multifocal. Nos demais órgãos não foram observadas lesões. Os Ovinos 5, 7 e 8 que receberam, respectivamente, dose única de 2,5g/kg e doses diárias de 0,63 e 1,25g/kg por 30 dias não adoeceram.



Fig.2. Intoxicação experimental por *Crotalaria pallida* em ovinos. Superfície dorsal dos pulmões, não-colabados, com edema subpleural acentuado e áreas vermelho-escuras.

DISCUSSÃO

Os ovinos apresentaram alta sensibilidade à ingestão de folhas verdes de *Crotalaria pallida*, pois doses únicas a partir de 2,5 a 40g/kg provocaram a morte dos animais em um

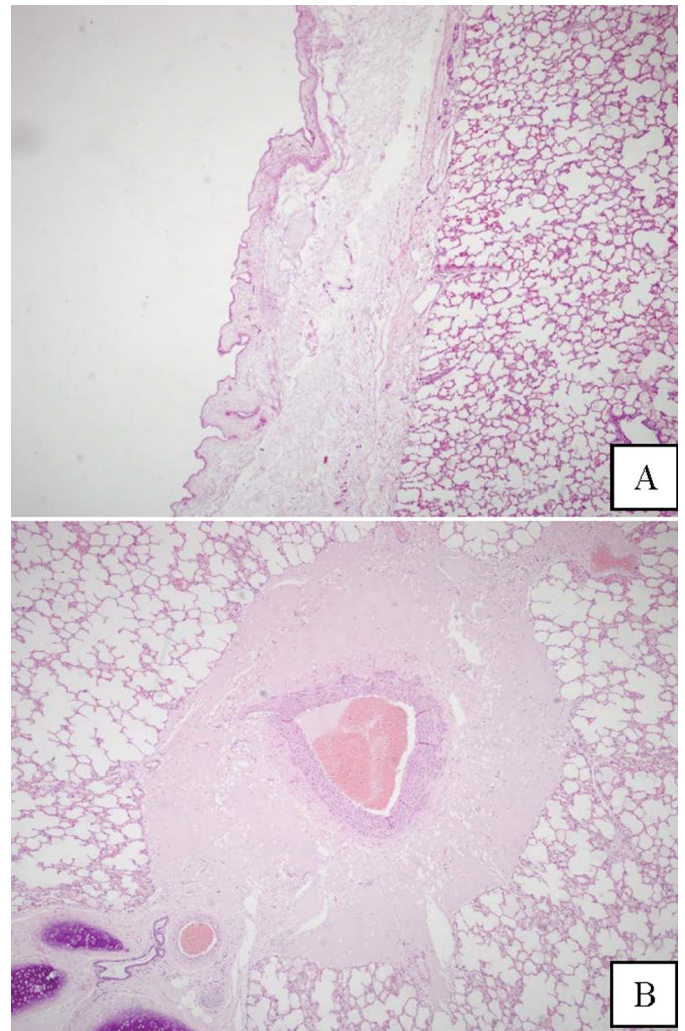


Fig.3. Intoxicação experimental por *Crotalaria pallida* em ovinos. (A) Edema subpleural (Ovino 4). HE, obj.5x. (B) Edema acentuado ao redor da artéria peribronquial (Ovino 4). HE, obj.10x.

intervalo de 13 a 22 horas após o fornecimento da planta. No experimento realizado por Laws (1968) as doses letais para os ovinos foram próximas a 10g/kg. Em contrapartida, Tokarnia & Döbereiner (1982) verificaram em bovinos, mortes com doses únicas a partir de 25g/kg.

Doses diárias de 0,63 e 1,25g/kg de *C. pallida* para os ovinos não ocasionaram efeito acumulativo, já que os animais que receberam a planta durante 30 dias, não adoeceram. Estes resultados foram compatíveis com os experimentos realizados em bovinos por Tokarnia & Döbereiner (1982), pela administração de folhas verdes de *C. pallida* nas doses de 2,5, 5 e 10g/kg durante 120, 60 e 30 dias, respectivamente, pois não manifestaram sinais clínicos. Por outro lado, sementes moídas dessa planta administradas também para bovinos em doses diárias de 5, 7,5 e 10g/kg durante 47 a 61 dias, causaram sinais clínicos entre 47 e 80 dias após o início da administração (Boghossian et al. 2007).

Edema pulmonar acentuado foi a principal lesão macroscópica verificada nos ovinos deste estudo. Na microscopia a distribuição e a intensidade do edema foram iguais

em todos os pulmões avaliados, e era muito intenso ao redor das artérias peribronquiais e peribronquiolares, no espaço subpleural e interlobular. Estes achados contribuem significativamente para o diagnóstico definitivo. As lesões microscópicas pulmonares observadas nos ovinos são diferentes das descritas na intoxicação por *C. pallida* em bovinos, nos quais havia espessamento das paredes alveolares e da parede das arteríolas, com diminuição da luz e fibrose periarteriolar (Boghossian et al. 2007). Esta diferença pode estar relacionada ao período de evolução da doença, uma vez que em ovinos, a evolução rápida não permitiu o desenvolvimento de alterações crônicas nos pulmões.

Outras espécies de *Crotalaria* também foram associadas a alterações pulmonares, como a *C. juncea* em equinos, em que observam-se alveolite fibrosante difusa, com espessamento dos septos alveolares, formação de membrana hialina e epiteliação alveolar (Nobre et al. 1994). Em suínos, *C. spectabilis* causa edema pulmonar interlobular e lesão hepática aguda concomitante (Ubiali et al. 2011).

A toxicidade das plantas do gênero *Crotalaria* tem sido atribuída a grande quantidade de monocrotalina, que é um alcalóide pirrolizidínico (AP). A metabolização dos APs ocorre principalmente no fígado e caracteriza-se pela formação de compostos pirrólicos que são, na maioria das vezes, catalisados pelo sistema enzimático citocromo P450 (Cheeke 1994). Os ésteres pirrólicos são agentes alquilantes que inibem a mitose celular no fígado, mas a síntese de DNA permanece contínua. Eles também induzem à necrose e perda de hepatócitos, que posteriormente são substituídos por tecido fibroso (Petry et al. 1984). Apesar de não se saber exatamente porque em alguns animais ocorre somente lesão pulmonar, Kim et al. (1993), constataram que os pulmões também produzem pirróis por conter enzimas do sistema citocromo P450. O mecanismo de formação do edema pulmonar não foi esclarecido. No entanto a monocrotalina extraída de espécies de *Crotalaria* é utilizada com frequência como modelo para reproduzir hipertensão pulmonar em animais de laboratório (Lee et al. 2005).

CONCLUSÕES

As folhas verdes de *Crotalaria pallida* quando ingeridas por ovinos, em doses únicas a partir de 2,5g/kg produzem doença respiratória aguda e o principal sinal clínico é dispnéia grave, seguida de morte em alguns minutos após o início dos sinais clínicos.

As lesões macroscópicas da intoxicação por *C. pallida* caracterizam-se por hidrotorax e edema pulmonar.

No exame microscópico, observou-se edema pulmonar marcadamente acentuado ao redor das artérias peribronquiais e peribronquiolares, no espaço subpleural e interlobular.

Doses diárias de 0,63 e 1,25g/kg de folhas verdes de *Crotalaria pallida* administradas por 30 dias, não causaram efeito acumulativo em ovinos.

REFERÊNCIAS

- Boghossian M.R., Peixoto P.V., Brito M.F. & Tokarnia C.H. 2007. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 27(4):149-156.
- Borelli V. 2015. Intoxicação espontânea e experimental por folhas verdes de *Crotalaria (mucronata) pallida* em ovinos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, SC. 53p.
- 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.
- Kim H.Y., Stermitz F.R., Molyneaux R.J., Wilson D.W., Taylor D. & Coulombe R.A. Jr. 1993. Structural influences on pyrrolizidine alkaloid-induced cytopathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122:61-69.
- Laws L. 1968. Toxicity of *Crotalaria mucronata* to sheep. *Aust. Vet. J.* 44(10):453-455.
- Lee Y.S., Bryun J., Kim J.A., Lee J.S., Kim K.L., Suh Y.L., Kim J. M., Jang H.S., Lee J.Y., Shin I.S., Suh W., Jeon E.S. & Kim D.K. 2005. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. *Exp. Mol. Med.* 37:27-35.
- Lemos R.A.A., Dutra I.S., Souza G.F., Nakazato L. & Barros C.S.L. 1997. Intoxicação espontânea por *Crotalaria mucronata* em bovinos em Minas Gerais. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 64(Supl.). 46p.
- Nobre D., Dagli M.L.Z. & Haraguchi M. 1994. *Crotalaria juncea* intoxication in horses. *Vet. Human Toxicol.* 36:445-448.
- Petry T.W., Bowden G.T., Huxtable R.J. & Sipes I.G. 1984. Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res.* 44:1505-1509.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 274p.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1982. Intoxicação experimental por *Crotalaria mucronata* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2(2):77-85.
- Ubiali D.G., Boabaid F.M., Borges N.A., Caldeira F.H.B., Lodi L.R., Pescador C.A., Souza M.A. & Colodel E.M. 2011. Intoxicação aguda com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae) em suínos. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):313-318.