

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* (CANNABACEAE) EM EQUINOS

PAULO MOTA BANDARRA

Porto Alegre
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* (CANNABACEAE) EM EQUINOS

Autor: Paulo Mota Bandarra

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: David Driemeier

Co-orientador: Cláudio Estêvão Farias da Cruz

Porto Alegre
2010

B214i Bandarra, Paulo Mota

Intoxicação por *Trema micrantha* (Cannabaceae) em equinos. / Paulo Mota Bandarra. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

55 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. David Driemeier, Orient.

1. Patologia veterinária 2. Intoxicação por plantas 3. *Trema micrantha* 4. Necrose hepática: equinos 5. Encefalopatia hepática: equinos I. Driemeier, David, Orient. II. Cruz, Cláudio Estevão Farias da, Co-orient. III. Título

CDD 619.6026

PAULO MOTA BANDARRA

INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* (CANNABACEAE) EM EQUINOS

Aprovado em 08 de Fevereiro de 2010.

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e presidente da comissão

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz
Co-orientador

Prof. Dr. Aldo Gava
Membro da Comissão

Dr^a. Ana Lúcia Schild
Membro da Comissão

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Mãe, Maria de Fátima Mota Bandarra, por tudo que ela fez em toda minha vida, pelo apoio e amor incondicional, eu a amo muito.

Ao meu Pai, Paulo Bento Bandarra, por ter me instigado desde criança, através de livros, documentários, mergulhos e saídas de campo, a me interessar pela ciência e a fascinação pela vida animal.

A minha Irmã, Cristiane Mota Bandarra, pelo amor e companheirismo.

A minha namorada, Giovana Borges Peres, a Gica, pelo companheirismo, amor e paciência, principalmente naquelas saídas inesperadas que aconteciam bem no final de semana.

Ao meu orientador, David Driemeier, por ter me dado oportunidade, pelo companheirismo, amizade, pelas horas de descontração e boas risadas, por me aturar há tantos anos e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

Ao meu co-orientador, Cláudio Cruz, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas risadas, pela grandiosa ajuda nos artigos e por ser um grande exemplo de profissional e caráter.

Ao professor Franklin Riet-Correa pela oportunidade de acompanhar o seu trabalho, pela amizade e a grande inspiração que isto proporcionou.

À minha colega, Caroline Pescador, pela grande ajuda no período de graduação, pelas oportunidades, pela amizade, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação.

Ao meu colega e amigo José Reck Júnior pela valorosa ajuda nos exames bioquímicos.

Aos meus colegas, Cristiano Feltrin e Gustavo Oliveira pela grande amizade e lealdade.

Aos colegas do SPV: DJ, Uruguaio, Saulo, Danilinho, Ogro, Eduardo, Pedroso, Hugo, Nádia, Adri, Fabí, Lú, Tati, Priscila, pela ajuda fundamental, pelos momentos diários de descontração e pela amizade.

Aos estagiários do SPV, Gregório, Karine, Gabriel, Luiz (Alemão), Verônica, Marcele, Pili, Ana Paula, pela amizade e grande ajuda.

Às funcionárias Ângela, Marília e Bárbara, pela ajuda, pela amizade e pelas risadas.

Aos colegas que já passaram pelo setor e deixaram grande amizade, Mauro Borba, Pedro Bezerra, Vacaria, Dé, Moleta, Daiene Loss, Eliza Teixeira e Xênia.

Aos colegas de outros laboratórios, Felipe (os cara são f...), Zé Carlos (Batata), Magro Luciano, Diego (Magro), Diego (Codorninha), Fighera, Daniel Rissi, Bruno, Aline, Glauco, Alan, Antônio Flávio, Kézia, Letícia, Clairton, Mauro Soares e Natália, pela companhia nos congressos e pela amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me acolher todos estes anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Trema micrantha</i> – Características botânicas, distribuição e utilizações.	13
2.2 Intoxicações por plantas do gênero <i>Trema</i>	15
2.2.1 Intoxicações por <i>Trema tomentosa</i>	15
2.2.2 Intoxicações espontâneas por <i>Trema micrantha</i>	16
2.2.3 Intoxicações experimentais por <i>Trema micrantha</i>	16
3. ARTIGO 1	19
4. ARTIGO 2	29
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto de uma árvore de <i>Trema micrantha</i> em crescimento.	14
Figura 2: Detalhe de um galho de <i>Trema micrantha</i> com o aspecto das folhas e frutos.	14
Figura 3: Intoxicação experimental por <i>Trema micrantha</i> em equinos. Equino 2. A – Animal com dificuldade de deglutição evidenciada pelo acúmulo de alimento na bochecha do lado direito. B – Restos de feno mastigados encontrados no chão da baia.	46
Figura 4: Intoxicação experimental por <i>Trema micrantha</i> em equinos. Sinais clínicos. Equino 3. A – animal apático, com a cabeça baixa e membros abertos. B – Animal em decúbito esternal, apoinando a cabeça no chão.	46
Figura 5: Intoxicação experimental por <i>Trema micrantha</i> em equinos. Equino 3. Hemorragias equimóticas difusamente distribuídas no mesentério.	47
Figura 6: Intoxicação experimental por <i>Trema micrantha</i> em equinos. Hemorragia acentuada no córtex da adrenal.	47
Figura 7: Intoxicação experimental por <i>Trema micrantha</i> em equinos. Fezes ressecadas no reto.	47

RESUMO

INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* (CANNABACEAE) EM EQUINOS

Este estudo caracteriza a intoxicação por *Trema micrantha* em equinos, até então desconhecida nesta espécie. No primeiro artigo (artigo 1), é descrito um surto espontâneo de intoxicação por *T. micrantha* em equinos que ocorreu em junho de 2007, no Município de São José do Herval, na região da encosta da serra do Rio Grande do Sul. Dois equinos morreram na propriedade, após uma árvore de *T. micrantha* ter sido derrubada por um temporal e suas folhas terem sido consumidas pelos animais. O quadro clínico patológico apresentado foi característico de insuficiência hepática aguda, com desenvolvimento de encefalopatia hepática. Subsequentemente, para melhor caracterizar a intoxicação por *Trema micrantha* em equinos, desenvolveu-se um experimento (artigo 2). Quatro pôneis receberam e consumiram espontaneamente folhas de *T. micrantha*, em doses únicas de 30, 25 e 20g/kg. Um equino recebeu uma dose de 15 e outra de 25g/kg, 30 dias após. Três animais adoeceram e evoluíram para morte. Os principais sinais clínicos apresentados foram apatia, desequilíbrios, dificuldade de deglutição, decúbito esternal, decúbito lateral, movimentos de pedalagem coma e morte. Os três equinos afetados apresentaram elevação na atividade sérica de gama glutamil transferase (GGT), nos níveis séricos de amônia, além de diminuição da glicemia. Os principais achados patológicos foram encontrados no fígado e no encéfalo dos três animais. O fígado apresentava macroscopicamente acentuação do padrão lobular, enquanto que no encéfalo havia áreas amareladas na superfície de corte, mais evidentes na substância branca do cerebelo. Microscopicamente, o fígado apresentava necrose, predominantemente centrolobular e hemorragia. No encéfalo, havia edema perivascular generalizado e astrócitos Alzheimer tipo II na substância cinzenta. Esses astrócitos apresentaram marcação fraca ou negativa na imuno-histoquímica anti-GFAP e marcação positiva do antígeno S-100. A dose letal mínima de folhas de *T. micrantha* estabelecida nesse experimento foi de 20g/kg. A maior sensibilidade da espécie equina constatada nesse estudo, a ampla distribuição de *T. micrantha*, bem como sua palatabilidade reforçam a importância da planta em casos acidentais de intoxicação nessa espécie.

Palavras chave: Equinos, intoxicação por plantas, *Trema micrantha*, necrose hepática, encefalopatia hepática.

ABSTRACT

Trema micrantha (CANNABACEAE) POISONING IN HORSES

This study characterizes *Trema micrantha* poisoning in horses, previously unknown in this species. The first article (Article 1) describes an outbreak of *T. micrantha* poisoning in horses. The disease occurred in June 2007, in the Municipality of São José do Herval, Rio Grande do Sul State. Two horses died after consuming the leaves of the branches from a *T. micrantha* tree, which had been felled by a storm. Clinical pathology presented by the animals was characteristic of an acute liver failure with development of hepatic encephalopathy. To further characterize the *Trema micrantha* poisoning in horses, an experiment was carried out (Article 2). Four ponies received and spontaneously consumed green leaves of *T. micrantha*, at the doses of 30, 25, and 20 g/kg. One horse received two doses, 15 and 25 g/kg, 30 days apart. Three animals were affected and died. The main clinical signs were apathy, equilibrium deficit, deglutition difficulty, sternal or lateral recumbency, paddling, coma and death. These tree diseased ponies had also enhanced seric activity of gamma-glutamyl transferase (GGT), seric ammonia apart of diminished glycemia. The main pathological findings were observed in the liver and encephalon. There were enhanced lobular pattern of the livers and yellowish areas in the cut surface of the encephalon, especially visualized in the cerebral white matter. Microscopically, there was hepatic necrosis predominantly centrilobular apart of hemorrhages. Generalized perivascular edema and Alzheimer type II astrocytes were observed in the encephalon. The Alzheimer type II astrocytes showed weak or absent anti-glial fibrillar acid protein immunostaining associated with positive immunostaining for S-100 protein. The minimal lethal dose of *Trema micrantha* leaves was established at 20 g/kg. The high sensibility of this species to this plant, its wide distribution, and the high palatability of the plant reinforce the importance of *Trema micrantha* in accidental episodes of intoxication in horses.

Key words: Equine, plant poisoning, *Trema micrantha*, liver necrosis, hepatic encephalopathy.

1. INTRODUÇÃO

Trema micrantha (fam. Cannabaceae) é popularmente conhecida como candiúba, grandiúva ou pau-de-pólvora. Intoxicações naturais e experimentais por *Trema micrantha* são descritas em caprinos (TRAVERSO *et al.* 2002; 2003). A intoxicação experimental também foi reproduzida em bovinos (TRAVERSO *et al.* 2004) e coelhos (TRAVERSO; DRIMEMEIER, 2002). As doses tóxicas de *Trema micrantha* foram de 30g/Kg em caprinos (TRAVERSO *et al.* 2002), 35g/kg em coelhos (TRAVERSO; DRIEMEIER, 2002) e 50g/kg em bovinos (TRAVERSO *et al.* 2004). Na Austrália, *Trema tomentosa* é descrita como naturalmente tóxica para equinos (HILL; WILLS; DOWLING; 1985) e camelos (TRUEMAN; POWEL, 1991) e experimentalmente para bovinos, caprinos, ovinos e animais de laboratório (MULHEARN, 1942; OELRICHS, 1968).

O quadro clínico-patológico observado é de insuficiência hepática aguda por necrose hepatocelular. Os sinais clínicos descritos na intoxicação por *Trema micrantha* em bovinos e caprinos consistem de apatia, anorexia, sialorreia, tremores musculares, disfagia, agressividade, relutância ao movimento, icterícia, decúbito esternal, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, coma e morte. Os achados macroscópicos mais significativos observados nestas intoxicações são encontrados no fígado e consistem em acentuação do padrão lobular, visível nas superfícies capsular e de corte caracterizada por áreas vermelhas escuras, deprimidas, delimitadas por áreas claras e hemorragias aleatórias. Histologicamente a lesão hepática é caracterizada por necrose centrolobular com tumefação e vacuolização de hepatócitos periportais (TRAVERSO *et al.* 2002; 2003; 2004). No Brasil três gêneros de plantas são reconhecidamente hepatotóxicas para equinos. *Crotalaria retusa* no Estado da Paraíba (NOBRE *et al.* 2004) e *Senecio spp* no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (GAVA; BARROS, 1997) contém alcaloides pirrolizidínicos e causam quadros clínico-patológicos característicos de fibrose hepática, enquanto que, *Brachiaria humidicola* é responsável por casos de fotossensibilização hepatógena em equinos no Estado do Pará (BARBOSA *et al.* 2006). Nenhuma planta que cause um quadro clínico-patológico de necrose hepática aguda, característico da intoxicação por *Trema micrantha*, é descrita em equinos no Brasil.

O objetivo do presente estudo é relatar a ocorrência de intoxicação natural por *Trema micrantha* em equinos no Estado do Rio Grande do Sul e descrever a reprodução

experimental da intoxicação nesta espécie. Além disso, salienta as alterações clínico-patológicas dos animais afetados, além de comprovar a toxidez de *Trema micrantha* para equinos e determinar a dose tóxica para esta espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Trema micrantha* – Características botânicas, distribuição e utilizações.

Trema micrantha (fam. Cannabaceae), conhecida popularmente como grandiúva, crindiúva, pau-pólvora, periquiteira, curindiba, é uma espécie arbórea, perene, ereta, bastante ramificada, de copa alargada e crescimento rápido que atinge 5 à 15 metros de altura (Figura 1). Seu tronco é ereto, podendo chegar a 40cm de diâmetro, de casca inteira ou levemente fissurada, madeira mole e pouco resistente. Sua folhas são alternas, com margens características serruladas, base arredondada e ápice agudo com até 12cm de comprimento e 5cm de largura (Figura 2). Suas flores são pequenas, pouco vistosas e de coloração creme. Os frutos são drupas globosas com 2-3mm de diâmetro, de coloração amarelada, avermelhada ou roxa na maturação (KISSMANN, 2000; LORENZI, 2000).

A planta ocorre em diversas condições ecológicas, menos em áreas muito úmidas. Prefere solos porosos e com boa fertilidade, florescendo e frutificando nos meses de abril e maio (KISSMANN, 2000, LORENZI, 2000). É encontrada em grande parte da América do Sul, e também nas Américas Central e do Norte. No Brasil está amplamente distribuída em formações florestais e como vegetação secundária em terrenos abandonados. É infestante agressiva em campos de pastagem nativa e áreas desocupadas. (PIO-CORREA, 1984; VASQUEZ, 1998; KISSMANN, 2000).

É uma planta de fácil estabelecimento na formação de florestas mistas e é utilizada como espécie pioneira em sistemas de reflorestamento e recuperação de solos degradados (CASTELLANI; AGUIAR, 1998). Suas folhas são prontamente consumidas pelo gado, especialmente em épocas de estiagem, e em certas regiões a folhagem é fornecida aos animais. As flores são melíferas e os frutos são avidamente consumidos pelas aves, que contribuem para sua distribuição. A madeira é aproveitada em carvoarias, mas outros usos são limitados (KISSMANN, 2000, LORENZI, 2000).



Figura 1: Aspecto de uma árvore de *Trema micrantha* em crescimento.



Figura 2: Detalhe de um galho de *Trema micrantha* com o aspecto das folhas e frutos.

2.2 Intoxicações por plantas do gênero *Trema*

Relatos de intoxicações por plantas do gênero *Trema* são descritas na Austrália pela espécie *Trema tomentosa* desde 1942 (MULHEARN, 1942) e no Brasil por *Trema micrantha* desde 2000 (TRAVERSO; DRIEMEIER, 2000).

2.2.1 Intoxicações por *Trema tomentosa*

Um surto de intoxicação em equinos associado ao consumo de *T. tomentosa* foi observado por HILL *et al.* (1985) na Austrália. Quatro equinos morreram após consumirem a planta e apresentaram sinais clínicos semelhantes aos de cólica aguda com postura rígida, relutância ao movimento, dispneia, poliúria e taquicardia. Na necropsia, a única alteração observada foi encontrada no fígado que estava friável e tinha aspecto “moteado”. Microscopicamente o fígado dos três animais mais afetados apresentava necrose de coagulação centrolobular e hemorragia. No equino menos afetado havia tumefação e necrose centrolobular discreta e proliferação de ductos biliares.

Um surto de intoxicação por *T. tomentosa* em camelos foi observado por TRUEMAN & POWELL (1991) após os animais serem colocados em um parque na Austrália e consumirem a planta. Os sinais clínicos apresentados foram anorexia, fraqueza, diarreia e morte. Na necropsia os animais apresentaram hemorragias no tecido subcutâneo, rúmen, abomaso, duodeno e fígado. Microscopicamente no fígado de um camelo analisado havia necrose de coagulação aguda massiva com severa hemorragia.

A reprodução experimental da intoxicação por *T. tomentosa* foi realizada por MULHEARN (1942) em bovinos, ovinos e caprinos através da administração da planta e por OELRICHS (1986) em animais de laboratório pela ingestão de trematoxina, princípio tóxico extraído das folhas de *T. tomentosa*.

2.2.2 Intoxicações espontâneas por *Trema micrantha*

No Brasil, surtos associados à ingestão de *Trema micrantha* foram descritos em caprinos no Rio Grande do Sul (TRAVERSO *et al.* 2003, 2005). No primeiro surto observado por TRAVERSO *et al.* (2003) dois caprinos mantidos estabulados morreram após folhas verdes de *T. micrantha* serem cortadas, após a derrubada de árvores e fornecidas aos animais no cocho. Um caprino foi necropsiado e foi observada icterícia e palidez da carcaça e hemorragias no tecido subcutâneo. O fígado estava amarelado, friável e com padrão lobular evidente. Microscopicamente havia necrose hepática centrolobular com hemorragia. No encéfalo havia vacuolização e necrose de neurônios no córtex e hipocampo.

Um segundo surto foi observado por TRAVERSO *et al.* (2005) em uma propriedade onde sete animais morreram, de um total de 42, após consumirem as folhas de uma árvore de *T. micrantha* que havia caído. Foi observada apatia progressiva nos animais afetados e morte 48 horas após o início dos sinais clínicos. No fígado de dois animais necropsiados foi identificado aumento do padrão lobular e microscopicamente havia necrose hepatocelular que variava de centrolobular à difusa e intensa hemorragia.

2.2.3 Intoxicações experimentais por *Trema micrantha*

Intoxicação experimental por *T. micrantha* foi realizada em coelhos (TRAVERSO; DRIEMEIER 2000), caprinos (TRAVERSO *et al.* 2002) e bovinos (TRAVERSO *et al.* 2004).

2.2.3.1 Reprodução experimental em coelhos

Em coelhos a planta foi tóxica a partir de 35g/kg. Os animais intoxicados apresentavam anorexia, diarreia, tremores musculares e incoordenação a partir de 24 horas após a ingestão. A morte dos animais ocorria entre 2 a 5 dias após a ingestão das folhas. Na necropsia foi observado fígado pálido e friável, hemorragias no tecido subcutâneo e edema da serosa do estômago, intestino delgado e vesícula biliar. Microscopicamente havia vacuolização e necrose hepatocelular centrolobular e

alterações degenerativas e necróticas em neurônios do tronco cerebral, córtex, hipocampo, medula e cerebelo (TRAVERSO; DRIEMEIER 2000).

2.2.3.2 Reprodução experimental em caprinos

Em caprinos *T. micrantha* foi tóxica a partir de 30g/kg. Os sinais clínicos iniciaram-se dois dias após a ingestão e ocorreram em seis caprinos, cinco dos quais morreram em até quatro dias. Os animais doentes permaneciam longos períodos em estação, com cabeça baixa, olhar fixo, apáticos e inapetentes. Tenesmo, incoordenação e movimentos rítmicos laterais da cabeça também foram observados. Todos os animais afetados apresentaram aumento na atividade sérica de gama glutamil transferase e em um animal foi constatada a queda na glicemia. Na necropsia o fígado apresentava-se pálido, friável e com acentuação do padrão lobular. Petéquias foram constatadas no tecido subcutâneo, no mediastino e nas serosas dos órgãos abdominais. Microscopicamente havia necrose hepatocelular de coagulação centrolobular que, em alguns casos, atingia todo o lóbulo, associada à congestão, hemorragia e alterações degenerativas nos hepatócitos circunjacentes. No cérebro havia tumefação de neurônios, principalmente no córtex, associada a edema perivascular e perineuronal (TRAVERSO *et al.* 2002).

2.2.3.3 Reprodução experimental em bovinos

Em bovinos, *T. micrantha* causou sinais clínicos em doses superiores à 50g/kg e morte a partir de 54g/kg. Os sinais clínicos iniciaram a partir de 16 horas após a ingestão da planta e as mortes entre 67 e 153 horas após a ingestão. Os animais apresentavam apatia, anorexia, sialorreia, fraqueza progressiva, coma e morte. Sinais neurológicos como pressionar a cabeça contra obstáculos e movimentos laterais de cabeça foram observados. Na necropsia o fígado se apresentava friável, com padrão lobular acentuado e áreas de hemorragia. Hemorragias petequiais foram observadas nas serosas dos órgãos abdominais. Microscopicamente havia necrose hepatocelular de coagulação que variava de centrolobular à massiva e hemorragia centrolobular acentuada. Necrose tubular renal foi observada em dois animais. Alterações histológicas foram encontradas no sistema nervoso central de cinco animais e consistiam de edema

perineuronal e perivascular com basofilia e retração de neurônios, principalmente no córtex frontal TRAVERSO *et al.* 2004).

3. ARTIGO 1

Neste item é apresentado o artigo que relata as intoxicações naturais por *Trema micrantha* em equinos ocorridas em uma propriedade em 2007 e que foi aceito para publicação no periódico Equine Veterinary Journal e será publicado no ano de 2010.

Case Report

Trema micrantha toxicity in horses in Brazil

P. M. BANDARRA, S. P. PAVARINI, D. L. RAYMUNDO, A. M. R. CORRÊA, P. M. O. PEDROSO, D. DRIEMEIER*

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia 91540-000, Porto Alegre-RS, Brasil.

Key words: hepatotoxicity; horses; hyperammonemia; poisoning; *Trema micrantha*.

*Corresponding author: Tel.: 0055 51 33086107 / Fax: 33087305. E-mail address: davetpat@ufrgs.br (D. Driemeier).

Summary

After ingesting green leaves of *T. micrantha*, two horses showed apathy, locomotor deficit, blindness, recumbency, paddling, coma, and death. The main gross findings were scattered haemorrhages, enhanced lobular pattern of liver, and cerebral oedema. Histological changes included disseminated haemorrhages, massive hepatocellular necrosis, neuronal degeneration, Alzheimer type II astrocytes, and cerebral perivascular oedema. Clinicopathological findings, which were comparable with those observed in *Trema micrantha* poisoned ruminants, associated with epidemiological evidence suggested the diagnosis. *Trema micrantha* poisoning should be evaluated as a possible cause in the diagnosis of equine hepatopathy and occasional secondary encephalopathy.

Introduction

Many fast-growing pioneer trees compose the genus *Trema* (Ulmaceae), some of which have been proved to be toxic to livestock. *Trema micrantha* is widely distributed in South America, but it also occurs in Central and North Americas. In Brazil, *T. micrantha* is particularly abundant in woodland habitats or as secondary vegetation in derelict areas (Pio-Correa 1984; Vasquez 1998). *T. micrantha* has also been used as a pioneer tree in reforestation systems, especially for the recovery of burned or degraded soils (Castellani and Aguiar 1998; Kissmann 1999). *T. micrantha* leaves are palatable and readily consumed by cattle and other herbivores, especially in times of food shortage, occasions in which the plant has been used as source of forage (Kissmann 1999). The suspicion of *Trema micrantha* poisoning in livestock aroused from field observations in the past decade of small south Brazilian goat flocks and cattle herds. Subsequently, natural *T. micrantha* poisoning has been observed in goats (Traverso *et al.* 2003) and the experimental poisoning induced in rabbit, goats, and cattle at the doses of 30, 35, and 50g/kg bw, respectively (Traverso and Driemeier 2000; Traverso *et al.*

2004). Poison peach or *Trema tomentosa* (*T. aspera*), which has been shown to contain a trematoxin (Oelrichs 1968), has also been linked to poisoning in horses (Hill *et al.* 1985) and other animals (Mulhearn 1942; Mcckenzie *et al.* 1985; Trueman and Powell 1991). The clinico-pathological syndrome in *Trema micrantha* poisoning is characterised by hepatic insufficiency due to hepatocellular necrosis (Traverso *et al.* 2003; 2004). On the other hand, *T. micrantha* has been described as having analgesic, anti-inflammatory, and hypoglycemic properties (Barbera *et al.* 1992; Schoenfelder *et al.* 2006). This communication describes and discusses the clinical and pathological findings observed in an outbreak of *Trema micrantha* poisoning in horses.

Case history and clinical findings

The disease occurred in a ranch in southern Brazil, where two out of five horses were affected and died. Animals were kept in a 2.5-hectare paddock. Horses had been exclusively grazing at pastures. Natural poisoning occurred due to the consumption of green leaves of the branches of a *T. micrantha* tree (figure 1A) that had fallen during a storm 4 days before the outbreak. Branches of the plant showed clear evidence that parts had been bitten off. A 6-year-old mare and her 1-year-old colt were affected and showed locomotor deficit, apathy, lateral recumbency, paddling, intermittent tonic contractions of locomotor and neck muscles (figure 1B), and coma. The mare died 48 h after the onset of clinical signs and was necropsied 11 h after death. In addition to the above described clinical signs, the foal also went blind and remained recumbent and unconscious for 8 days, when it was euthanized *in extremis* by intravenous injection of barbiturates and immediately necropsied. The owner reported that the affected mare was the dominant animal in the group.

Postmortem findings

Necropsy was performed in both horses and samples of multiple tissues were collected, fixed in formalin, processed for histology, and stained using hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff¹ (PAS), or oil red² method (Johnson 1992). Liver presenting enhanced lobular pattern (figure 1C), haemorrhages in subcutaneous tissues and in thyroid and adrenal glands, apart from feces covered by mucus and blood, and mild to moderate cerebral oedema (figure 1D) were the main gross findings. Histological findings in the mare included centrilobular hepatocellular necrosis associated with haemorrhage, and moderate fatty hepatocellular degeneration in periportal areas (figure

2A). Severe subcapsular haemorrhage in the adrenal glands and in the thyroid, and moderate diffuse congestion in heart, kidneys, and intestines were also seen. The foal had severe diffuse hepatocellular fatty degeneration, individual hepatocyte necrosis, and multifocal ductal proliferation. Cerebral cortex presented neuronal tumefaction with varying numbers of Alzheimer type II astrocytes (figure 2B). Additionally, all levels of the brain and cerebellum had perivascular oedema characterised by extravasated protein globules best visualized in PAS stained sections (Figure 2B). Also, tumefaction and tubular necrosis were detected in kidneys. Refrigerated fresh samples of brain, cerebellum, and cervical spinal cord from both horses were analyzed by direct immunofluorescence of rabies, with negative results. Weak or absent anti-glial fibrillar acid protein³ immunostaining (1:500) associated with positive immunostaining for S-100 protein³ (1:200) performed on sections of cerebral cortex indicated the presence of Alzheimer type II astrocytes (Summers *et al.* 1995).

Discussion

T. micrantha poisoning was suspected upon clinical and pathological study of findings (Traverso *et al.* 2003; 2004) associated with the presence of the plant in the paddock where affected animals had been kept. Evidence that parts of the plant had been bitten off and the absence of other known causes of hepatotoxicity confirmed the diagnosis. The condition described here may have been associated with monopolization of the fallen tree by dominant individuals, which therefore may have ingested larger quantities of green leaves of *Trema micrantha* as compared to the other animals in the paddock. Certainly the good palatability of *T. micrantha* (Traverso *et al.* 2004) has played a role in the disease described here. In Brazil, sporadic cases of hepatotoxicity in horses have also been linked to the consumption of *Senecio brasiliensis*, *Crotalaria retusa*, and *Brachiaria decumbens*; however, none of these plants has been associated with acute liver necrosis. On the other hand, numerous plants may cause acute liver necrosis in ruminants in Brazil (Tokarnia *et al.* 2002; Riet-Correa and Méndez 2007). Centrilobular hepatocellular degeneration and necrosis are particularly common findings in association with hepatotoxic insults and may be due to particularities of blood flow and high enzymatic activity of the mixed-function oxidases in this region of the hepatic lobule (Cullen 2007). Haemorrhages may be secondary to the damaged liver due to the excessive consumption of coagulation factors in necrotic insults as well as to the inability to further synthesize coagulation factors and platelets (Stalker and Hayes

2007). Neurological findings were probably linked to hepatic encephalopathy and associated with the action of neurotoxins, especially ammonia, and possibly with several other phenomena such as alterations in neurotransmission, permeability of the blood-brain barrier, and energy metabolism (Häussinger *et al.* 2002). Astrocytes exhibiting signs of Alzheimer type II degeneration, cerebral edema, and neuronal degeneration have all been described in cases of hepatic encephalopathy (Häussinger *et al.* 2002; Cullen 2007; Norenberg *et al.* 2009). The foal affected by *T. micrantha* poisoning had been recumbent and exhibited impaired consciousness for at least 8 days before decision on euthanasia was made; therefore, it may be said that the animal could have survived longer. Except for the *Senecio*-associated chronic disease in horses (Gava and Barros 1997), such a long course of neurological failure due to hyperammonemia has not been seen with most of the Brazilian hepatotoxic plants (Tokarnia *et al.* 2002; Riet-Correa and Méndez 2007). Affected animals usually die sooner than that. Hepatic lesions were more severe in the mare than in its foal, which showed mainly degenerative liver changes, possibly manifested as a stage subsequent to the acute liver damage. This animal probably remained recumbent due to neurological deficit secondary to hyperammonemia. Nigropallidal encephalomalacia or 'chewing disease', a clinically similar condition caused by the consumption of *Centaurea solstitialis* (yellow star-thistle), affects horses in the USA, Argentina, and Australia (Humphreys 1988; Knight and Walter 2001), but not in Brazil. Theiler's disease, an acute and sporadic hepatic disease of unknown aetiology, has not been associated with acute hepatic necrosis and haemorrhage (Stalker and Hayes 2007), changes usually seen in *T. micrantha* toxicosis. Although cerebellar lesions in *Trema micrantha* poisoning may resemble those seen in cases of *Fusarium verticillioides*-induced equine leukoencephalomalacia, malacia is the predominant change induced by this mycotoxin-associated condition (Humphreys 1988; Morgavi and Riley 2007). In addition, these horses had been fed exclusively at pastures, in which there was no source of corn. Furthermore, the vascular lesions observed in cases of leukoencephalomalacia may also affect larger vessels (Maxie and Youssef 2007) than those seen in cases of *Trema micrantha* poisoning, in which plasma exudation occur only surround capillaries and has not been associated with malacia. Finally, liver failure caused by blue-green algal toxins (Humphreys 1988) is usually associated with a source of algae. Although field observations of *T. micrantha* poisoning in Brazil have been linked mainly to goat flocks,

the present report indicates that special caution should be taken when keeping horses in areas with *T. micrantha*.

Aknowledgements

This study was funded by The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Authors are grateful to Professor Cláudio Estêvão Farias da Cruz for reviewing this manuscript.

Manufactures' addresses

¹Merck S.A., Rio de Janeiro, Brazil.

²Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

³DAKO, Carpinteria, California, USA.

References

- Barbera, R., Trovato, A., Rapisarda, A. and Ragusa, S. (1992) Analgesic and anti-inflammatory activity in acute and chronic conditions of *Trema guineense* (Schum. Et Thonn.) Ficalho and *Trema micrantha* Blume extracts in rodents. *Phytother. Res.* **6**, 146-148.
- Castellani, E.D. and Aguiar, I.B. (1998) Preliminary conditions for germination of *Trema micrantha* (L.) Blume seeds. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambien.* **2**, 80-83.
- Cullen, J.M. (2007) Liver, Biliary System and Exocrine Pancreas. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th edn., Ed: M.D. McGavin and J.F. Zachary, Mosby Elsevier, St. Louis, pp 393-461.
- Gava, A. and Barros, C. (1997) *Senecio* sp. poisoning of horses in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* **17**, 36-40.
- Häussinger, D., Schliess, F. and Kircheis, G. (2002) Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 256-259.
- Hill, B.D., Wills, L.D. and Dowling, R.M. (1985) Suspected poisoning of horses by *Trema aspera* (poison peach). *Aust. Vet. J.* **6**, 107-108.
- Humphreys, D.J. (1988) *Veterinary Toxicology*, 3rd edn, Baillière Tindall, London, pp 222-309.

- Johnson, F.B. (1992) Lipids. In: *Laboratory Methods in Histotechnology*, Ed: E.B. Prophet, B. Mills, J.B. Arrington and L.H. Sobin, American Registry of Pathology, Washington, pp 175-182.
- Kissmann, K.G. (1999) Plantas Infestantes e Nocivas. BASF, São Paulo, pp 643-644.
- Knight, A.P. and Walter, R.G. (2001) *A guide to plant poisoning of animals in North America*. Chapter 6. Plants affecting the nervous system, Section II. Teton New Media, pp 225-226.
- Maxie, M.G. and Youssef, S. (2007) Nervous system. In: *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn, vol 1, Ed: M.G. Maxie, K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Elsevier, St Louis, pp 358–359.
- Mckenzie, R.A., Green, P.E., Thornton, A.M., Chung, Y.S., Mackenzie, A.R., Cybinski, D.H. and St. George, T.D. (1985) Diseases of deer in south eastern Queensland. *Aust. Vet. J.* **62**, 424.
- Morgavi, D.P. and Riley, R.T. (2007) An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **137**, 201-212.
- Mulhearn, C.R. (1942) Poison peach (*Trema aspera*): a plant poisonous to stock. *Aust. Vet. J.* **18**, 68-72.
- Norenberg, M.D., Rama Rao, K.V. and Jayakumar, A.R. (2009) Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metabol. Brain Dis.* **24**, 103-117.
- Oelrichs, P.B. (1968) Isolation and purification of trema toxin from *Trema aspera*-d inst adsorption chromatography inst thin layer chromatography. *Phytochem.* **7**, 1691-1693.
- Pio-Correa, M. (1984) *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, vol. II. Ministério da Agricultura, Brasília, pp 439.
- Riet-Correa, F. and Méndez, M.C. (2007) Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: *Doenças de ruminantes e eqüídeos*, 3rd edn, vol 2, Ed: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Lemos, R.A.A. and Borges, J.R.J., Pallotti, Santa Maria, pp 99-221.
- Schoenfelder, T., Cirimbelli, T.M. and Citadini-Zanette, V. (2006) Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmacea) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 456-459.
- Stalker, M.J. and Hayes, M.A. (2007) Liver and biliary system. In: *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn, vol 1, Ed: M.G. Maxie, K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Elsevier, St Louis, pp 297-381.
- Summers, A.B., Cummings, J.F. and de Lahunta, A. (1995) *Veterinary Neuropathology*, Mosby, St Louis, pp 210-211.
- Tokarnia, C. H., Döbereiner, J. and Peixoto, P. V. (2002) Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon* **40**, 1635-1660.

- Traverso, S.D. and Driemeier, D. (2000) Experimental *Trema micrantha* (Ulmaceae) poisoning in rabbits. *Vet. Human. Toxicol.* **42**, 301-302.
- Traverso, S.D., Colodel, E.M., Loretto, A.P., Corrêa, A.M.R. and Driemeier, D. (2003) Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. *Ciênc. Rural* **33**, 133-136.
- Traverso S.D., Corrêa, A.M.R., Schmitz, M., Colodel, E.M. and Driemeier, D. (2004) Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* **24**, 211-216.
- Trueman, K.F. and Powell, M.W. (1991) Suspected poisoning of camels by *Trema tomentosa* (poison peach). *Aust. Vet. J.* **68**,213-214.
- Vasquez, Y.C. (1998) *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae): a promising neotropical tree for site amelioration of deforested land. *Agrofor. Syst.***40**, 97-104.

Figure legends.

Fig. 1. A. *Trema micrantha* tree that have fell during a storm. The subsequent access of horses to their leaves caused the poisoning. Insert: detail of the plant. **B.** Recumbent colt poisoned by *T. micrantha* during an episode of generalized tonic muscular contraction. **C.** Liver from a *T. micrantha* poisoned mare. Note enhanced lobular pattern. **D.** Cerebrum of a *T. micrantha* poisoned colt. Transverse section at the level of cerebellum and cerebellar peduncles. Note oedematous white substance characterised by a yellowish coloration in circled areas of the cerebellar vermis (top) and pons (bottom).

Fig. 2. A. Liver of a *T. micrantha* poisoned mare. Severe centrilobular hepatocyte necrosis, moderate diffuse fat degeneration, and severe diffuse hepatic haemorrhage. (HE, 40x). **B.** Cortex frontal from a *T. micrantha* poisoned colt. Capillary vessel showing extravasated plasma and hyaline globules (arrow heads) and Alzheimer type II astrocytes (arrows). (PAS, 400x)

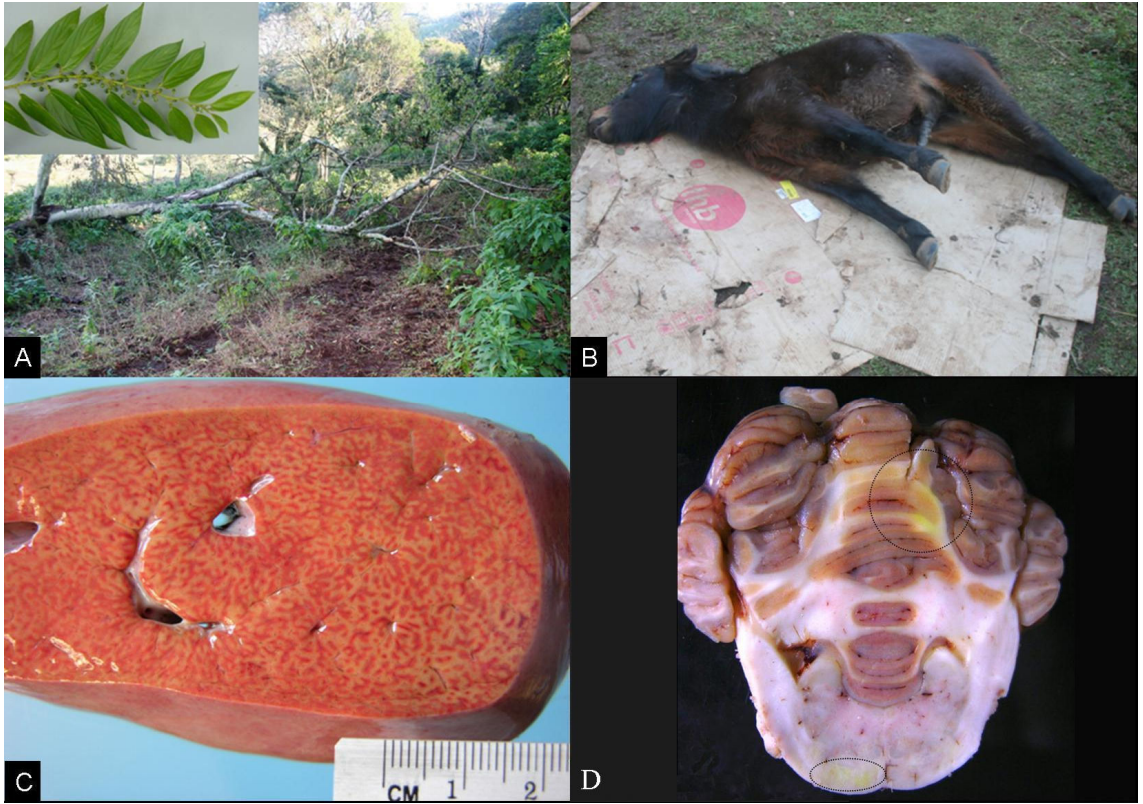


Figure 1

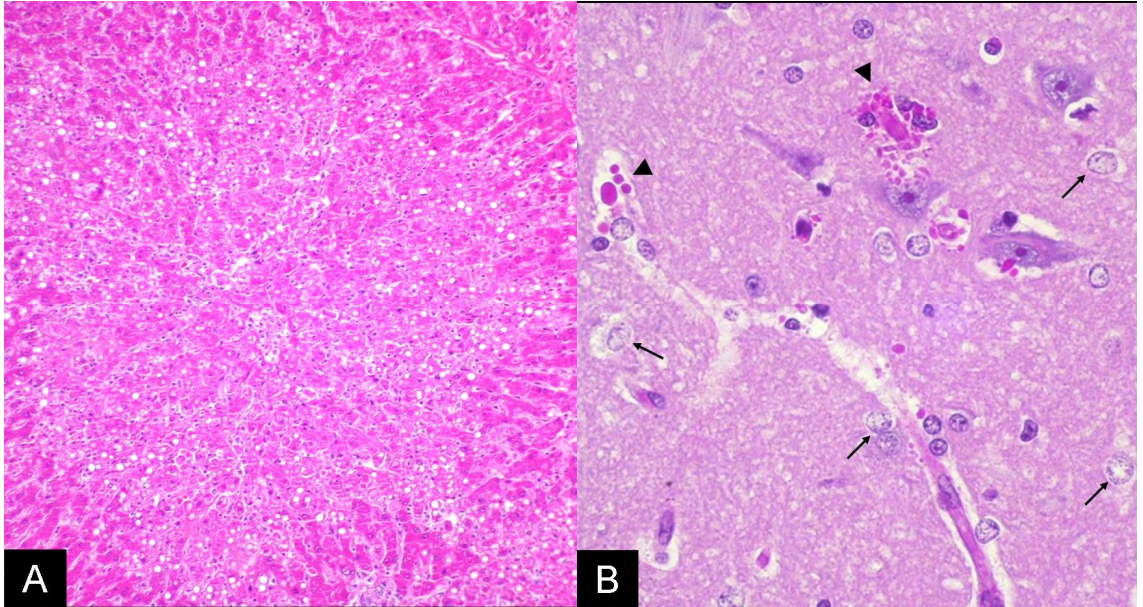


Figure 2

4. ARTIGO 2

Neste item é apresentado o artigo que relata o experimento realizado com o intuito de caracterizar a intoxicação por *Trema micrantha* em equinos. O artigo foi redigido segundo as normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira no qual será submetido em breve.

Trabalho.....

**Reprodução experimental da intoxicação por *Trema micrantha*
(Cannabaceae) em equinos¹**

Paulo M. Bandarra², Pedro S. Bezerra Júnior³, José Reck Júnior⁴, Luiz Gustavo S. de Oliveira², Mauro R. Borba², Gabriel L. F. Correa², André Gustavo C. Dalto² e David Driemeier²

ABSTRACT.- Bandarra P.M., Bezerra Júnior P.S., Reck Júnior J., Oliveira L.G.S., Borba M.R., Correa G.L.F., Dalto A.G.C & Driemeier D. 2010. [**Experimental poisoning by *Trema micrantha* (Cannabaceae) in equines.**] Reprodução experimental da intoxicação por *Trema micrantha* (Cannabaceae) em equinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

The green leaves of *Trema micrantha* were spontaneously consumed by three ponies at unique doses of 20, 25, and 30g/kg. An additional pony received 15 and 25g/kg of the plant, 30 days apart. While this animal that received two doses had not showed clinical disease, the other three ponies developed clinical disease characterized by apathy, equilibrium deficit, deglutition difficulty, sternal or lateral recumbency, paddling, coma and death. These three diseased ponies had also enhanced seric activity of gamma-glutamyl transferase, seric ammonia apart of diminished glycemia. The three ponies were necropsied and fragments from numerous organs were collected for histology and immunostaining (IS) study. The main pathological findings were observed in the liver

¹ Recebido em
Aceito para publicação em

² Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil.

⁴ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brasil.

and encephalon. There were enhanced lobular pattern of the livers and yellowish areas in the cut surface of the encephalon, especially visualized in the cerebral white matter. Microscopically, there was hepatic necrosis predominantly centrilobular apart of hemorrhages. Generalized perivascular edema and Alzheimer type II astrocytes were observed in the encephalon. The Alzheimer type II astrocytes showed weak or absent anti-gliial fibrillar acid protein IS associated with positive IS for S-100 protein. The minimal lethal dose of *Trema micrantha* leaves was established at 20g/kg. The high sensibility of this species to this plant, the wide distribution, and the high palatability of the plant reinforce the importance of *Trema micrantha* in accidental episodes of intoxication in horses.

INDEX TERMS: Equine, toxic plants, *Trema micrantha*, liver necrosis, hepatic encephalopathy.

Resumo.- O objetivo desse estudo foi caracterizar a intoxicação por *Trema micrantha* em equinos. Três pôneis com idade entre 2 e 7 anos consumiram espontaneamente folhas de *T. micrantha* em doses únicas de 30g/kg, 25g/kg e 20g/kg. Outro equino recebeu 15 e 25g/kg da planta com intervalo de 30 dias entre as doses. Três animais adoeceram e evoluíram para morte. Coletas diárias de sangue foram realizadas para análises bioquímicas. Os principais sinais clínicos apresentados foram apatia, desequilíbrios, dificuldade de deglutição, decúbito esternal, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, coma e morte. Os três equinos afetados apresentaram elevação da atividade sérica de gama-glutamil transferase, dos níveis séricos de amônia e diminuição da glicemia. Esses animais foram necropsiados e fragmentos de diversos órgãos foram coletados para análise histopatológica e imuno-histoquímica. Os principais achados patológicos foram encontrados no fígado e no encéfalo dos três animais. O fígado apresentava macroscopicamente acentuação do padrão lobular; enquanto que, no encéfalo havia áreas amareladas na superfície de corte, mais evidentes na substância branca do cerebelo. Microscopicamente, o fígado apresentava necrose predominantemente centrolobular e hemorragia. No encéfalo, havia edema perivascular generalizado e astrócitos Alzheimer tipo II, na substância cinzenta. Esses astrócitos apresentaram marcação fraca ou negativa na imuno-histoquímica anti-GFAP e marcação positiva do antígeno S-100. A dose letal mínima de folhas de *T. micrantha* estabelecida nesse experimento foi de 20g/Kg. O equino que recebeu duas doses com

intervalo de 30 dias não apresentou alteração clínica. A alta sensibilidade da espécie equina constatada nesse experimento, a ampla distribuição de *T. micrantha* e a palatabilidade da planta reforçam a importância da planta em casos acidentais de intoxicação nessa espécie.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Equinos, intoxicação por plantas, *Trema micrantha*, necrose hepática, encefalopatia hepática.

INTRODUÇÃO

Trema micrantha (fam. Cannabaceae), conhecida popularmente como grandíuva, paupólhora e periquiteira (Lorenzi 2000) é uma espécie arbórea de crescimento rápido que atinge de 5 a 15 metros de altura, ocorre em grande parte da América do Sul, sendo também encontrada nas Américas Central e do Norte. No Brasil está amplamente distribuída em formações florestais e como vegetação secundária em terrenos abandonados (Pio-Correa 1984, Vasquez 1998, Kissmann 2000). É utilizada como espécie pioneira em sistemas de reflorestamento e recuperação de solos degradados (Castellani & Aguiar 1998). As folhas são palatáveis e prontamente consumidas pelos bovinos e outras espécies herbívoras, especialmente em épocas de escassez de alimento (Kissmann 2000). Intoxicações naturais por *T. micrantha* foram observadas em caprinos que eram mantidos estabulados e cujas folhas foram administradas propositalmente (Traverso et al. 2003) e em outra propriedade onde a planta foi consumida após a queda de uma árvore (Traverso et al. 2005). Em equinos, a intoxicação natural foi observada em uma propriedade após consumo acidental de uma árvore derrubada por um temporal (Bandarra et al. 2010) e em outra propriedade onde uma árvore foi podada e os equinos tiveram acesso aos galhos (Bandarra, dados não publicados). A intoxicação foi induzida experimentalmente em bovinos (Traverso et al. 2004), caprinos (Traverso et al. 2002) e coelhos (Traverso & Driemeier 2000) em doses de 50, 30 e 35g/kg, respectivamente. Na Austrália, *Trema tomentosa*, na qual foi demonstrada a presença de um glicosídeo tóxico denominado trematoxina (Oelrichs 1968), tem sido associada com intoxicações em equinos (Hill et al. 1985) e outras espécies animais (Mulhearn 1942, Mcckenzie et al. 1985, Trueman & Powell 1991). O quadro clínico-patológico observado na intoxicação por plantas do gênero *Trema* é de insuficiência hepática aguda por necrose hepatocelular (Traverso et al. 2003, 2004). O objetivo desse trabalho foi determinar a toxidez das folhas de *T. micrantha* para a espécie equina, estabelecer a dose tóxica,

determinar o quadro clínico-patológico e as alterações bioquímicas observadas nessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse trabalho experimental foram utilizados quatro pôneis, sem raça definida, com idade entre 2 e 7 anos. Todos os equinos foram pesados antes do início do estudo. Os animais eram mantidos em baias individuais de alvenaria, com piso de cimento e cama de maravalha. A alimentação era constituída de feno de alfafa, ração comercial própria para a espécie e água *at libitum*. As folhas de *T. micrantha* foram coletadas no Município de Porto Alegre e fornecidas no mesmo dia. Os animais consumiram espontaneamente a dose fornecida em um período menor que 24 horas. A dose fornecida inicialmente a um equino (equino 1) foi de 30g/kg de peso vivo, baseada na dose tóxica observada em caprinos (Traverso et al. 2002). Após, foram fornecidas doses decrescentes de 25g/kg (equino 2), 20g/kg (equino 3) e 15g/kg (equino 4). Ao equino 4 que recebeu uma dose de 15g/kg, foi fornecida uma dose adicional de 25g/kg, 30 dias após o consumo da primeira dose. Os animais foram submetidos a exames clínicos diários e amostras de sangue foram coletadas diariamente em tubos sem anticoagulante para avaliação da atividade sérica de gama glutamil transferase (GGT) e dos níveis séricos de amônia. Amostras de sangue também foram coletadas em tubos com fluoreto de sódio para determinação da glicemia. A determinação da atividade sérica de GGT foi realizada através de ensaio automatizado em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA), utilizando o kit γ -GT (Doles Reagentes, Goiânia, GO, Brasil) baseado no método de Naftalin modificado (Naftalin et al. 1969). Os níveis de glicose foram determinados em amostras de plasma obtido após centrifugação (2500 rpm/10 min.) do sangue coletado em fluoreto de sódio. A dosagem de glicose foi realizada através de ensaio automatizado em espectrofotômetro de microplacas, utilizando o kit Glicose Enzimática Liq (Doles Reagentes, Goiânia, GO, Brasil) baseado no método de glicose oxidase (Trinder 1969). Os níveis de amônia sérica foram quantificados através de ensaio automatizado em espectrofotômetro de microplacas, de acordo com protocolo estabelecido por Verdouw e colaboradores (1978), baseado no método do indofenol. Os valores de GGT, glicose e amônia foram expressos como a média de quatro replicatas técnicas. Os equinos 1, 2 e 3 foram necropsiados logo após a morte e fragmentos de diversos órgãos foram coletados

em formalina tamponada 10%, processados conforme métodos histológicos de rotina e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Algumas secções selecionadas de fígado e encéfalo foram coradas pela técnica do ácido periódico de Schiff (PAS). Fragmentos de córtex cerebral foram submetidos ao teste imuno-histoquímico utilizando anticorpo contra a proteína ácida glial fibrilar (GFAP) e ao antígeno S-100, empregando-se o método de streptavidina-biotina ligada à peroxidase (diluição: GFAP 1:500, Dako, Santa Barbara, CA; S-100 1:200, Dako). O cromógeno utilizado foi vermelho VECTOR®NovaRED e o contra corante, hematoxilina de Harris.

RESULTADOS

Sinais Clínicos

A evolução do quadro clínico observada na intoxicação experimental por *T. micrantha* e as doses utilizadas no experimento estão sintetizadas no quadro 1. Sinais clínicos da intoxicação foram observados em 3 equinos (1, 2 e 3). Todos os animais que apresentaram quadro clínico evoluíram para óbito. A menor dose que causou morte dos animais foi de 20g/Kg (equino 3). O equino 4 que recebeu 15g/Kg de folhas frescas da planta e 25g/kg 30 dias após a primeira dosagem não adoeceu.. Os primeiros sinais clínicos observados variaram de 18 a 96 horas após o consumo das folhas de *T. micrantha*. A evolução clínica variou de 22 a 61 horas. Os sinais clínicos apresentados pelos animais inicialmente eram caracterizados por apatia acompanhada de fezes contendo muco e, por vezes, estrias de sangue. Os sinais clínicos evoluíram para dificuldade em se levantar, desequilíbrio ao se movimentar, arrastamento das pinças dos membros dianteiros ao caminhar, incapacidade de deglutição (evidenciada pela presença de feno mastigado nas bochechas e no chão da baia) e icterícia. Posteriormente, os equinos apresentavam desequilíbrio ao permanecer em estação, tremores de cabeça, ptose labial e apoiavam a cabeça com o queixo no chão, quando em decúbito esternal. O equino 2 apresentou agressividade nesse estágio e tentava escoicear e morder quando manipulado. Por fim, os animais apresentavam incapacidade de permanecer em estação e até mesmo em decúbito esternal, permanecendo em decúbito lateral, apresentavam trismo, movimentos de pedalagem e coma seguido de morte.

Análises clínicas

Os resultados da mensuração da atividade enzimática de GGT e dos níveis séricos de glicose e amônia estão apresentados nas figuras 1, 2 e 3. Alterações superiores aos valores de referência (4-44 UI/L) de atividade sérica de GGT foram constatados nos equinos 1, 2 e 3, respectivamente em 48, 120 e 72 horas após o consumo das folhas de *T. micrantha*. Nos equinos 1 e 3, os valores de atividade sérica dessa enzima apresentaram aumento até a morte. No equino 3, essa enzima apresentou um pico em 72 horas após o consumo da planta e diminuição dos valores nas 48 horas seguintes. Nos equinos 1, 2 e 3, os valores de glicemia atingiram níveis inferiores ao limite mínimo de referência (75mg/dL) a partir de 24-48 horas antes da morte. Os valores de amônia apresentaram níveis superiores aos de referência (13-110µg/dL) nos três equinos afetados, a partir das primeiras 24 horas após o consumo da planta e continuaram em elevação até o momento da morte. Não houve alteração em nenhum dos três parâmetros no equino 4, quando recebeu dosagem inicial de 15g/kg, nem quando foi submetido à dose de 25g/kg.

Achados de necropsia

As alterações macroscópicas observadas durante a necropsia foram semelhantes nos equinos afetados e foram evidenciadas no fígado, que apresentava acentuação do padrão lobular, notada nas superfícies capsular e de corte e caracterizada por áreas vermelho-escuras entremeadas por áreas mais claras (Fig.4). No encéfalo dos três equinos, após serem fixados e seccionados, foram observadas áreas focais amareladas na superfície de corte, melhor visualizadas na substância branca e evidenciadas principalmente no cerebelo (Fig.5). No tecido subcutâneo, havia petéquias discretas. As glândulas tireoides e adrenais apresentavam hemorragia difusa. No reto, as fezes estavam secas e envoltas por grande quantidade de muco. No equino 2, foram observadas petéquias e equimoses difusamente distribuídas no mesentério e conteúdo sanguinolento na luz do intestino delgado.

Achados microscópicos e imuno-histoquímicos

Os achados microscópicos dos equinos experimentalmente intoxicados foram evidenciados principalmente no fígado e encéfalo. No fígado do equino 1, havia necrose de coagulação predominantemente centrolobular de grau acentuado com acentuada picnose, cariólise e cariorrexia, além de numerosos corpúsculos eosinofílicos (Fig.6a). No equino 2, o fígado apresentava necrose massiva de hepatócitos, hemorragia difusa e

acentuada proliferação de ductos biliares (Fig.6b). No fígado do equino 3, havia vacuolização difusa e acentuada do citoplasma de hepatócitos, necrose centrolobular com escassos restos nucleares, infiltrado de macrófagos acentuado nessa região e corpúsculos eosinofílicos (Fig.6c). As alterações no encéfalo dos 3 equinos eram semelhantes, porém menos evidente no encéfalo do equino 1. Astrócitos tumefeitos com cromatina dispersa, muitas vezes formando grupos de dois ou mais astrócitos caracterizaram os astrócitos Alzheimer tipo II que foram visualizados na substância cinzenta do encéfalo, principalmente no córtex cerebral (Fig.7a). Esses astrócitos possuíam marcação fraca ou ausente quando submetidos à imuno-histoquímica anti-GFAP e positiva na imuno-histoquímica anti-S100. Hemorragia perivascular discreta e edema perivascular com extravasamento de glóbulos de proteína melhor visualizados na coloração de PAS foram visualizados difusamente distribuídos no encéfalo dos três equinos (Fig.7b), cujos rins demonstraram degeneração tubular difusa que variava de discreta a moderada.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A intoxicação por *T. micrantha* em equinos foi caracterizada nesse estudo. O quadro clínico-patológico observado na experimentação foi característico de insuficiência hepática aguda e semelhante ao observado nos equinos naturalmente intoxicados (Bandarra et al. 2010, Bandarra, dados não publicados). Todos os animais experimentados consumiram a planta espontaneamente e todas as doses fornecidas foram consumidas em um período inferior a 24 horas, que caracteriza a planta como palatável para a espécie. A dose letal mínima de folhas de *T. micrantha* estabelecida nesse experimento foi de 20g/Kg. Um equino recebeu uma dose de 15g/Kg que não causou alterações clínicas ou bioquímicas e, desta forma, não se mostrou tóxica para esse animal. Este mesmo equino recebeu uma segunda dose superior à dose tóxica estabelecida no experimento e ainda assim não desenvolveu alterações clínicas ou bioquímicas. É possível que esse equino tenha desenvolvido tolerância com a administração prévia de uma dose subletal. Resultados semelhantes foram observados com doses progressivas, a partir de uma dose subletal de larvas de *Perreyia flavipes* em ovinos (Raymundo 2008).

Os achados macroscópicos e histológicos observados nos animais desse experimento foram compatíveis com intoxicação por plantas hepatotóxicas de curso agudo. No Brasil, casos esporádicos de hepatotoxicidade em equinos têm também sido associados com o consumo de *Senecio brasiliensis* (Gava & Barros 1997), *Crotalaria retusa* (Nobre et al. 2004) e *Brachiaria decumbens* (Barbosa et al. 2006). Entretanto, nenhuma dessas plantas tem sido associada com necrose hepática aguda nessa espécie. Por outro lado, muitas outras plantas podem causar necrose hepática aguda em herbívoros no Brasil e devem ser consideradas como diagnóstico diferencial, pois é possível que também se apresentem tóxicas para equinos. Portanto, no diagnóstico diferencial devem ser incluídas intoxicações por *Cestrum corymbosum var. hirsutum*, *Cestrum intermedium*, *Cestrum laevigatum*, *Cestrum parqui*, *Crotalaria retusa*, *Dodonea viscosa*, *Myoporum laetum*, *Sessea brasiliensis*, *Vernonia molissima*, *Vernonia rubricaulis*, *Xanthium cavanillesii* (Tokarnia et al. 2002, Riet-Correa & Méndez 2007). Degeneração e necrose coagulativa centrolobular são achados particularmente comuns em insultos hepáticos e provavelmente devidos a particularidades da circulação sanguínea. Os hepatócitos da região centrolobular recebem menos oxigenação por estarem mais distantes da região porta, onde o sangue é mais oxigenado e à alta atividade enzimática das oxidases de função mista desta região do lóbulo hepático (Cullen 2007). Hemorragias podem ocorrer secundariamente ao dano hepático devido ao consumo excessivo dos fatores de coagulação nos insultos necróticos, assim como pela incapacidade do órgão sintetizar fatores de coagulação e plaquetas (Stalker & Hayes 2007).

As lesões neurológicas encontradas foram provavelmente decorrentes da encefalopatia hepática e associadas com a ação de neurotoxinas, especialmente amônia e possivelmente com outros fenômenos como alterações em neurotransmissores, permeabilidade da barreira hematoencefálica e metabolismo energético (Häussinger et al. 2002). A amônia é produzida no trato gastrointestinal pela degradação bacteriana de alimentos protéicos. Em animais saudáveis é detoxificada no fígado e convertida em ureia que é excretada na urina. Com a perda de um ciclo efetivo de ureia, o tecido nervoso metaboliza a amônia através de enzimas astrocíticas à glutamina, uma substância neurotóxica que tem sido associada com as alterações degenerativas nos astrócitos e edema cerebral (Brusilow 1986). Os astrócitos degenerados apresentam tipicamente núcleos aumentados, marcadamente vesiculares e frequentemente alongados, são circundados por um halo claro, indicativo de tumefação celular e são

chamados de astrócitos de Alzheimer tipo II. Estas células mantêm a marcação imuno-histoquímica positiva para o antígeno S-100, enquanto que a marcação é fraca ou ausente para GFAP. Isto sugere que a encefalopatia hepática causa uma perda seletiva nos filamentos GFAP (Zachary 2007, Summers et al. 1995). Astrócitos degenerados Alzheimer tipo II, edema cerebral e degeneração neuronal têm sido descritos em casos de encefalopatia hepática (Häussinger et al. 2002, Cullen 2007, Norenberg et al. 2009).

As análises bioquímicas realizadas revelaram que os animais intoxicados tiveram aumento da atividade sérica de GGT e dos níveis de amônia, assim como diminuição da glicemia. O aumento da atividade enzimática de GGT e a diminuição dos níveis séricos de glicose são conseqüências esperadas de insuficiência hepática (Stalker & Hayes 2007). Apesar de um efeito hipoglicêmico da *T. micrantha* ter sido demonstrado em ratos (Schoenfelder et al. 2006), o mecanismo pelo qual isto ocorre não foi elucidado. Em casos de necrose hepática zonal, o fígado remanescente pode se tornar insuficiente para manter a glicemia normal (Stalker & Hayes 2007). Hipoglicemia foi relatada também nas intoxicações experimentais por *T. micrantha* em caprinos (Traverso et al. 2002) e bovinos (Traverso et al. 2004) e por *Dodonea viscosa* (Cattani et al. 2004) e *Xanthium cavalinense* (Colodel et al. 2000) em bovinos. Nestes trabalhos a hipoglicemia foi relacionada com as lesões e sinais neurológicos observados.

A espécie equina se mostrou mais sensível à intoxicação por *Trema micrantha* que as demais espécies estudadas anteriormente (Traverso & Driemeier 2000, Traverso et al. 2002, Traverso et al. 2004). A alta sensibilidade dessa espécie aliada à palatabilidade e ampla distribuição da planta reforçam a importância de *T. micrantha* como causa de intoxicações acidentais em equinos.

Agradecimentos.- Aos colegas de pós-graduação e estagiários do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela ajuda. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e ao professor Cláudio Estêvão Farias da Cruz, pela revisão deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Bandarra P.M., Pavarini S.P., Raymundo D.L., Corrêa A.M.R., Pedrosa P.M.O & Driemeier D. 2010. *Trema micrantha* toxicity in horses in Brazil. Equine Vet. J. (In publication).
- Brusilow S.W. 1986. Hepatic encephalopathy. N. Engl. J. Med. 314:786-787.
- Barbosa, J.D., Oliveira, C.M.C., Tokarnia, C.H. & Peixoto, P.V. 2008. Fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. Pesq. Vet. Bras. 26(3):147-153.

- Castellani E.D. & Aguiar I.B. 1998. Preliminary conditions for germination of *Trema micrantha* (L.) Blume seeds. Rev. Bras. Eng. Agric. Ambien. 2: 80-83.
- Cattani C.S., Colodel E.M., Traverso S.D., Correa A.M.R. & Driemeier D. 2004. Intoxicação experimental por *Dodonea viscosa* (Salpindaceae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 24(1):31-34.
- 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.
- Cullen, J.M. 2007. Liver, biliary system and exocrine pancreas. In: McGavin, M.D. & Zachary J.F. (Eds), Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, p.393-461.
- Gava A. & Barros C. S. L. 1997. *Senecio* spp. poisoning of horses in southern Brazil. Pesq. Vet. Bras.17: 36-40.
- Häussinger D., Schliess F. & Kircheis G. 2002. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. J. Gastroenterol. Hepatol. 17: 256-259.
- Hill B.D., Wills L.D. & Dowling, R.M. 1985. Suspected poisoning of horses by *Trema aspera* (poison peach). Aust. Vet. J. 6: 107-108.
- Kissmann, K.G. 2000. Plantas Infestantes e Nocivas. 2nd ed. BASF, São Paulo, p. 643-644.
- Lorenzi H. 2000. Plantas Daninhas do Brasil – Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas 3rd ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa. p. 471.
- Mckenzie R.A., Green P.E., Thornton A.M., Chung Y.S. & Mackenzie A.R., Cybinski, D.H. & St. George, T.D. 1985. Diseases of deer in south eastern Queensland. Aust. Vet. J. 62: 424.
- Mulhearn C.R. 1942. Poison peach (*Trema aspera*): a plant poisonous to stock. Aust. Vet. J. 18: 68-72.
- Naftalin L., Sexton M., Whitaker J.F. & Tracey D. 1969. A routine procedure for estimating serum gamma-glutamyltranspeptidase activity. Clin. Chim. Acta. 26(2):293-6.
- Nobre V.M.T., Riet-Correa, F., Filho, J.M.B., Dantas, A.F.M., Tabosa, I.M. & Vasconcelos, J.S. 2004. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. Pesq. Vet. Bras. 24 (3):132-143.
- Norenberg M.D., Rama Rao K.V. & Jayakumar A.R. 2009. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. Metabol. Brain Dis. 24: 103-117.
- Oelrichs P.B. 1968. Isolation and purification of trema toxin from *Trema aspera*-d inst adsorption chromatography inst thin layer chromatography. Phytochem. 7:1691-1693.
- Pio-Correa M. 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, vol. II. Ministério da Agricultura, Brasília, p. 439.
- Raymundo D.L. 2008. Intoxicação espontânea por larvas de *Perreyia Flavipes* (Pergidae) em ovinos e bovinos e intoxicação experimental em ovinos e coelhos. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 55p.
- Riet-Correa F. & Méndez, M.C. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas. p. 99-221. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Lemos, R.A.A. & Borges, J.R.J. (Eds). Doenças de Ruminantes e Eqüídeos, 3rd ed. Pallotti, Santa Maria.
- Schoenfelder T., Cirimbelli T.M. & Citadini-Zanette V. 2006. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmacea) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 107:456-459.

- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system, p.297-381. In: MAXIE, M.G. (Ed.) Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th ed. Elsevier, St Louis.
- Tokarnia C. H., Döbereiner J. & Peixoto P. V. 2002. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*. 40:1635-1660.
- Traverso S.D., Corrêa A.M.R., Schmitz M., Colodel E.M. & Driemeier, D. 2004. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras*. 24:211-216.
- Traverso S.D. & Driemeier, D. 2000. Experimental *Trema micrantha* (Ulmaceae) poisoning in rabbits. *Vet. Human. Toxicol*. 42:301-302.
- Traverso S.D., Colodel E.M., Loretti A.P., Corrêa A.M.R. & Driemeier, D. 2003. Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. *Cienc. Rural* 33:133-136.
- Trinder P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*. 6:24-27.
- Trueman K.F. & Powell, M.W. 1991. Suspected poisoning of camels by *Trema tomentosa* (poison peach). *Aust. Vet. J*. 68:213-214.
- Vasquez Y.C. 1998. *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae): a promising neotropical tree for site amelioration of deforested land. *Agrofor. Syst*. 40:97-104.
- Verdouw H., Van Eched C. J. A. & Dekkers, E. M. J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res*. 12:99-402.

Legendas das Figuras

Fig.1. Gráfico apresentando os resultados da mensuração da atividade enzimática de GGT em relação ao tempo após o consumo das folhas de *Trema micrantha*.

Fig.2. Gráfico apresentando os resultados da mensuração da glicemia em relação ao tempo após o consumo das folhas de *Trema micrantha*.

Fig.3. Gráfico apresentando os resultados dos níveis séricos de amônia em relação ao tempo após o consumo das folhas de *Trema micrantha*.

Fig.4. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Fígado. Superfície de corte mostrando acentuação do padrão lobular (equino 1).

Fig.5. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Cerebelo. Superfície de corte mostrando área focal amarelada.

Fig.6. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Fígado. Aspecto microscópico do fígado dos três equinos intoxicados. A – Equino 1. Necrose de coagulação acentuada predominantemente centrolobular, HE. Obj. 10X. B – Equino 2. Necrose massiva de hepatócitos, hemorragia difusa e proliferação de ductos biliares. HE. Obj. 20X. C – Equino 3. Necrose de coagulação centrolobular com restos nucleares, infiltrado de macrófagos centrolobular e vacuolização dos hepatócitos adjacentes. HE. Obj. 10X.

Fig.7. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Córtex cerebral. A - Astrócitos tumefeitos com cromatina dispersa característicos de astrócitos Alzheimer tipo II. HE. Obj 20X. B - Extravasamento perivascular de glóbulos de proteína. PAS. Obj. 20X.

Quadro 1. Evolução do quadro clínico e doses utilizadas na intoxicação experimental por *Trema micrantha*

Equino	Dose (g/Kg)	Início dos sinais clínicos (horas)	Evolução clínica (horas)	Desfecho
1	30	18	61	Óbito
2	25	96	41	Óbito
3	20	95	22	Óbito
4 ^a	15	Sem sinais	-	Não adoeceu
4 ^b	25	Sem sinais	-	Não adoeceu

^a Primeira dose administrada a este equino.

^b Segunda dose administrada a este equino 30 dias após a primeira.

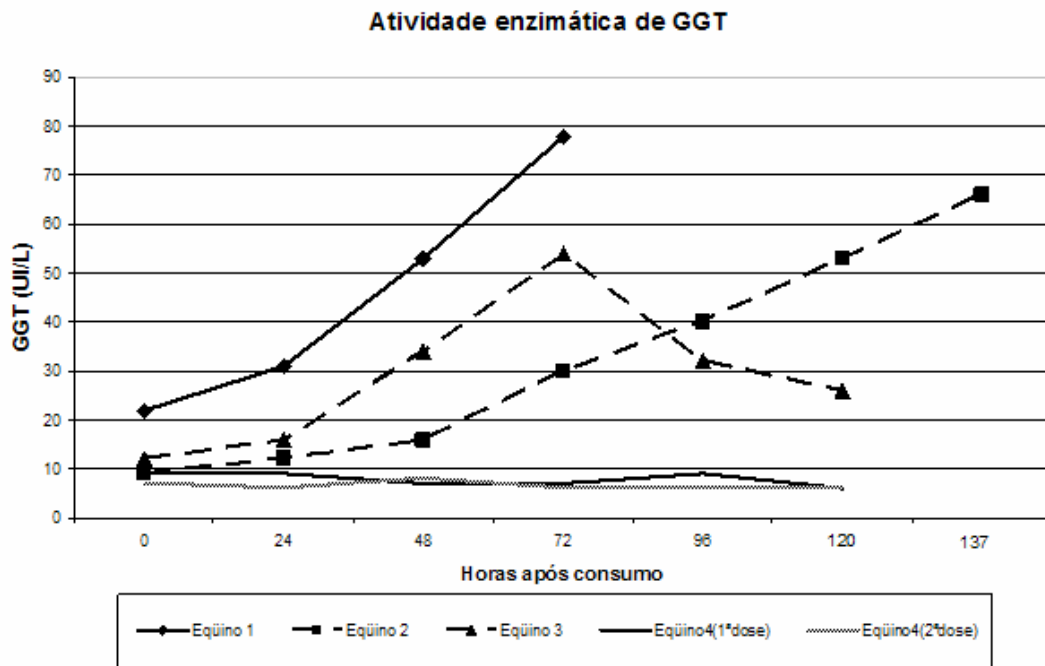


Figura 1

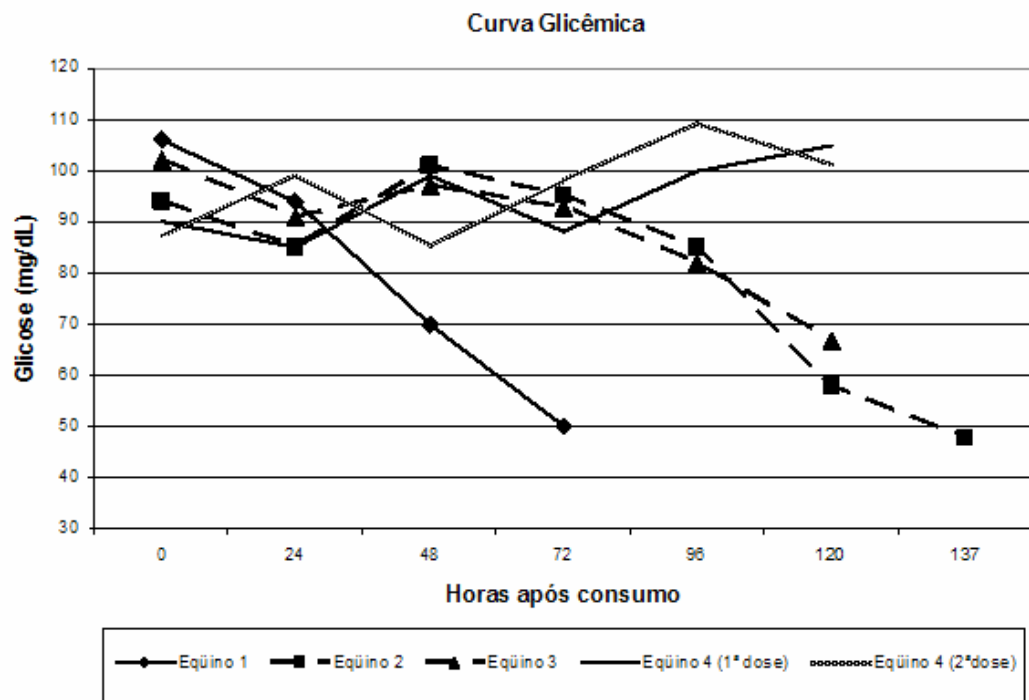


Figura 2

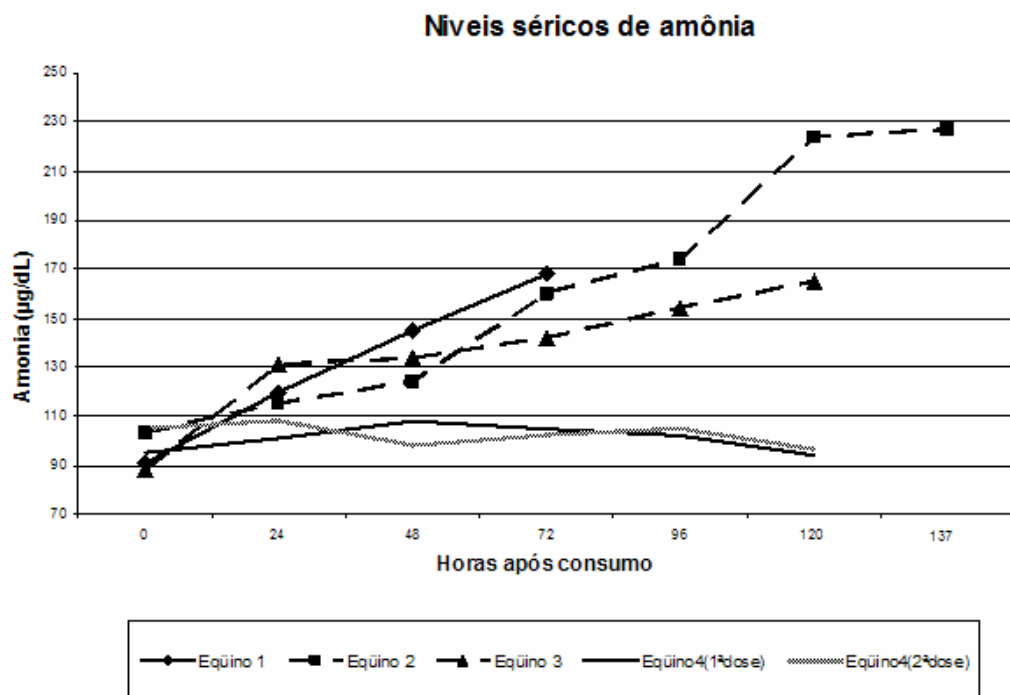


Figura 3

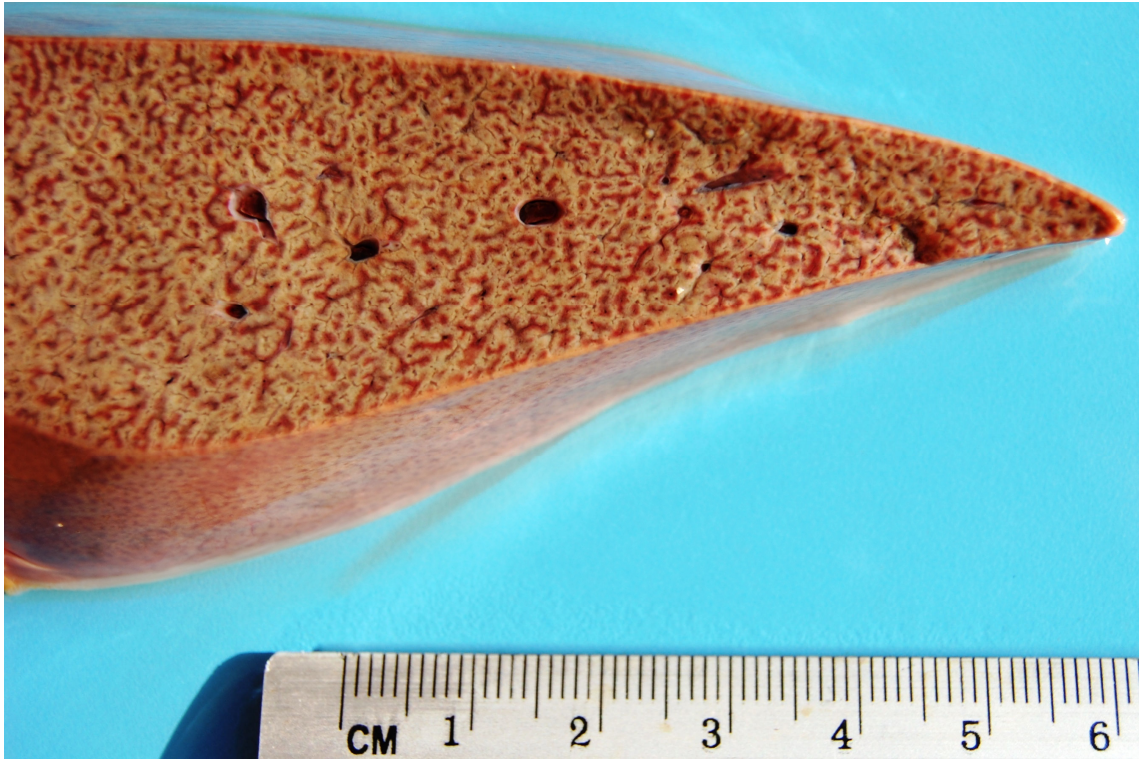


Figura 4

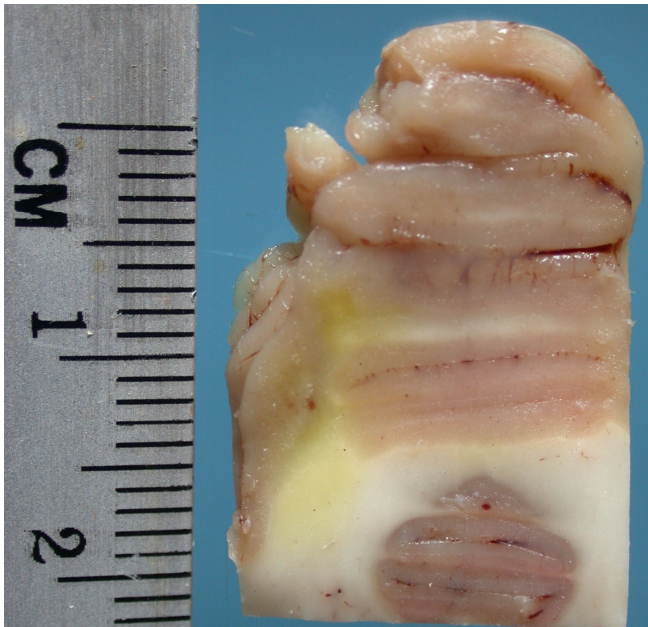


Figura 5

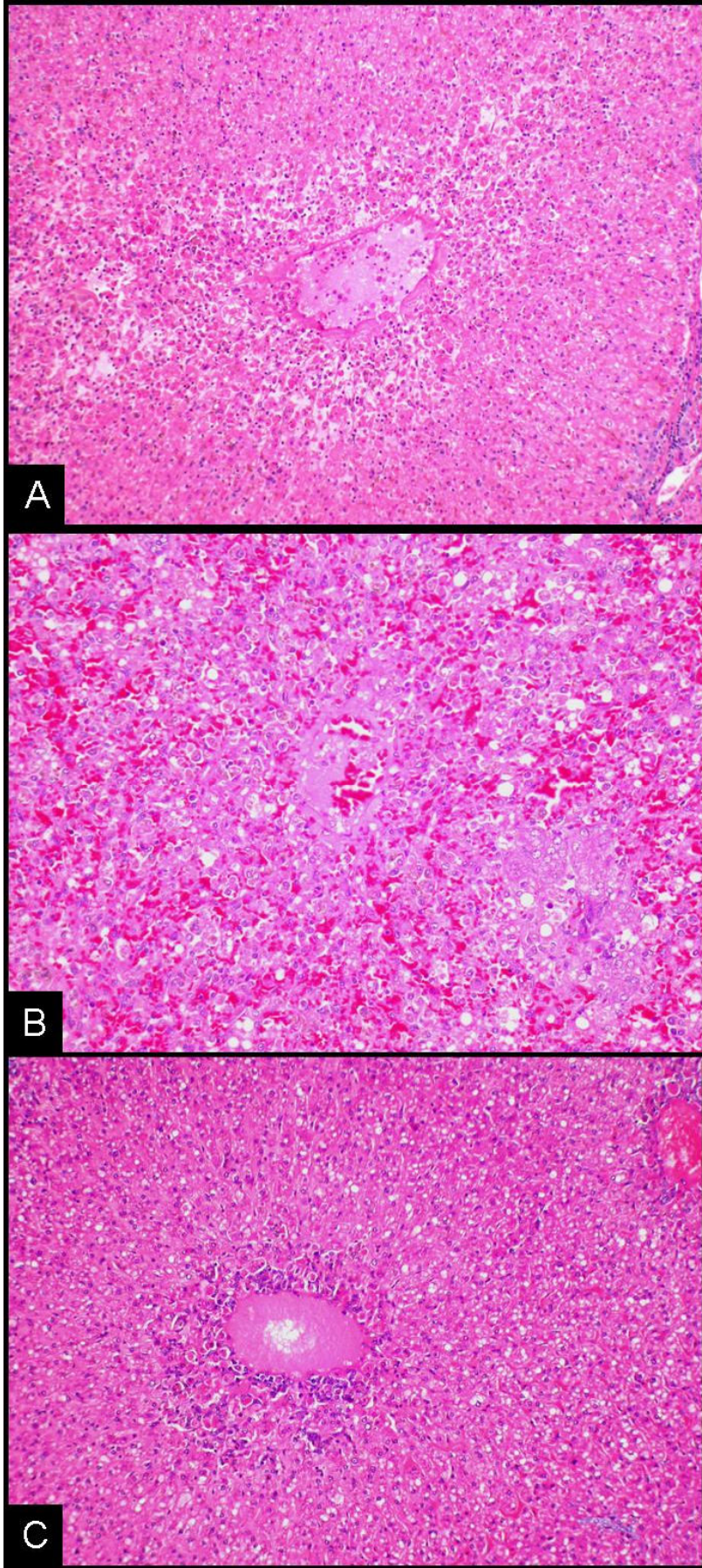


Figura 6

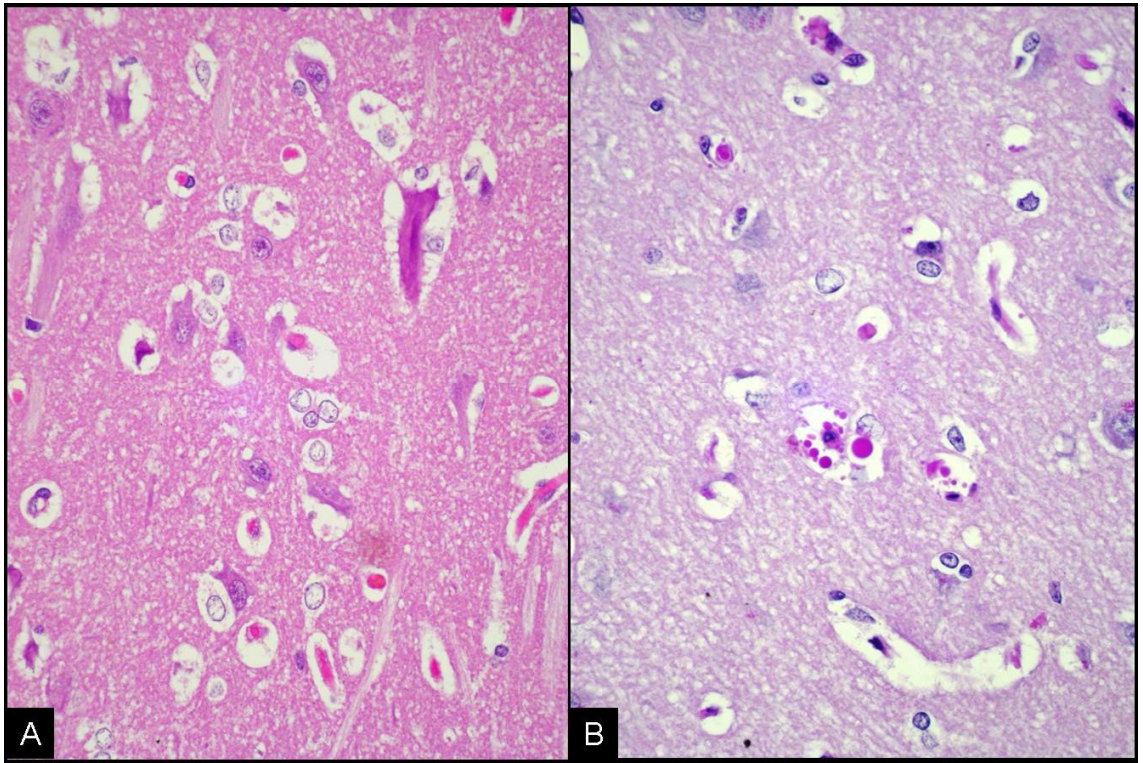


Figura 7

Figuras adicionais referentes a intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos.



Figura 3: Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Equino 2. A – Animal com dificuldade de deglutição evidenciada pelo acúmulo de alimento na bochecha do lado direito. B – Restos de feno mastigados encontrados no chão da baia.



Figura 4: Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Sinais clínicos. Equino 3. A – Animal apático com a cabeça baixa e membros abertos. B – Animal em decúbito esternal apoiando a cabeça no chão.



Figura 5: Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Equino 3. Equimoses difusamente distribuídas no mesentério.



Figura 6: Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Hemorragia acentuada na superfície do córtex da adrenal.



Figura 7: Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em equinos. Fezes ressecadas no reto.

5. DISCUSSÃO

Através deste estudo foi possível caracterizar a intoxicação espontânea por *T. micrantha* em equinos em seus aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos. A reprodução experimental demonstrou a toxicidade da planta para esta espécie animal.

A análise dos casos naturais e dos resultados do experimento realizado, através da caracterização dos achados clínicos, bioquímicos e patológicos demonstrou tratar-se de um quadro de insuficiência hepática aguda. A menor dose tóxica de folhas de *T. micrantha* para equinos foi de 20g/kg de peso corporal, que é inferior aos resultados encontrados experimentalmente em coelhos (35g/kg) (TRAVERSO; DRIEMEIER, 2000), caprinos (30g/kg) (TRAVERSO *et al.* 2003) e bovinos (50g/kg) (TRAVERSO *et al.* 2004). Desta forma, a espécie equina demonstrou ser a espécie mais sensível à intoxicação pelas folhas de *T. micrantha* já estudada.

No Brasil, casos esporádicos de hepatotoxicidade em equinos por ingestão de plantas foram associados com o consumo de *Senecio brasiliensis* (GAVA; BARROS, 1997), *Crotalaria retusa* (NOBRE *et al.* 2004) e *Brachiaria decumbens* (BARBOSA *et al.* 2006), entretanto, nenhuma destas plantas causa necrose hepática aguda nesta espécie. Por outro lado, muitas outras plantas podem causar necrose hepática aguda em herbívoros no Brasil (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002; RIET-CORREA; MÉNDEZ 2007) e devem ser consideradas como diagnóstico diferencial pois é possível que também se apresentem tóxicas para equinos. Portanto no diagnóstico diferencial devem ser incluídas intoxicações por *Cestrum corymbosum var. hirsutum* (GAVA *et al.*, 1991); *Cestrum intermedium* (GAVA; STOLF; VARASCHIN, 1996); *Cestrum laevigatum* (DÖBEREINER; TOKARNIA; CANELLA, 1969, PEIXOTO *et al.*, 2000); *Cestrum parqui* (RIET-CORREA; SCHILD; MÉNDEZ, 1986); *Crotalaria retusa* (NOBRE *et al.*, 2005); *Dodonea viscosa* (COLODEL *et al.*, 2003, CATTANI *et al.*, 2004); *Myoporum laetum* (RAPOSO *et al.*, 1998); *Sessea brasiliensis* (CANELLA; TOKARNIA; DÖBEREINER, 1968, CHAULET; PEIXOTO; TOKARNIA, 1990); *Vernonia molissima* (DÖBEREINER; TOKARNIA; PURISCO, 1976, GAVA; PEIXOTO; TOKARNIA, 1987) e *Vernonia rubricaulis* (TOKARNIA; DÖBEREINER 1982); *Xanthium cavanillesii* (MENDEZ; SANTOS; RIET-CORREA, 1998; DRIEMEIER *et al.*, 1999; COLODEL; DRIEMEIER; PILATI, 2000; LORETTI *et al.*, 1999).

Sabe-se que para ocorrer intoxicação por árvores como é o caso das plantas do gênero *Trema*, é necessário que algumas particularidades ocorram de forma semelhante ao que é descrito para *Prunus* sp e *Myoporum* sp. ou seja, para que os animais tenham acesso as folhas, as árvores precisam ser derrubadas por cortes, pelo vento ou ainda que sejam fornecidas propositalmente aos animais (RIET-CORREA & MÉNDEZ, 1993). Uma condição geralmente associada a ocorrência da intoxicação espontânea por plantas tóxicas é a fome. Muitas vezes surtos são relacionados a períodos de estiagem e escassez de pastagem. No caso da *T. micrantha*, por apresentar boa palatabilidade, esta condição não parece ser necessária.

O aumento da atividade enzimática de GGT e a diminuição dos níveis séricos de glicose são conseqüências esperadas de insuficiência hepática (STALKER; HAYES, 2007). Apesar do efeito hipoglicêmico da *T. micrantha* ter sido demonstrado em ratos (SCHOENFELDER *et al.*, 2006), o mecanismo pelo qual isto ocorre não foi elucidado. Em casos de necrose hepática zonal o fígado pode-se tornar insuficiente para manter a glicemia normal, que é um efeito direto da necrose (STALKER; HAYES, 2007).

Atividade hipoglicêmica também foi relatada nas intoxicações experimentais por *T. micrantha* em caprinos (TRAVERSO *et al.* 2002) e bovinos (TRAVERSO *et al.* 2004), por *Dodonea viscosa* (CATTANI *et al.* 2004) e *Xanthium cavalinense* (COLODEL *et al.* 2000) em bovinos. Nestes trabalhos a hipoglicemia foi relacionada com as lesões e sinais clínicos neurológicos observados.

Degeneração e necrose coagulativa centrolobular são achados particularmente comuns em insultos hepáticos e provavelmente devidos a particularidades da circulação sanguínea. Os hepatócitos da região centrolobular recebem menos oxigenação por estarem mais distantes da região porta onde o sangue é mais oxigenado e pela alta atividade enzimática das oxidases de função mista nesta região do lóbulo hepático (CULLEN, 2007).

Hemorragias são esperadas em casos de intoxicações hepáticas agudas, pois parte do processo de hemostasia depende do funcionamento normal do fígado (BADYLAK, 1988). Podem ocorrer secundariamente ao dano hepático, devido ao consumo excessivo dos fatores de coagulação nos insultos necróticos, assim como pela incapacidade do órgão de sintetizar fatores de coagulação e plaquetas (STALKER; HAYES, 2007). Algumas hepatotoxinas são descritas como causadoras de lesão endotelial, entre elas *Xanthium cavanillesii* (LORETTI *et al.*, 1999) e *Microcystis*

aeruginosa (JACKSON *et al.*, 1985), em ambos os casos pode-se observar hemorragias em diversos órgãos.

As lesões neurológicas encontradas foram provavelmente em decorrência da encefalopatia hepática e associada com a ação de neurotoxinas, especialmente amônia, e possivelmente com outros fenômenos como alterações em neurotransmissores, permeabilidade da barreira hemato-encefálica e metabolismo energético (HÄUSSINGER *et al.*, 2002). Astrócitos degenerados Alzheimer tipo II, edema cerebral e degeneração neuronal têm sido descritos em casos de encefalopatia hepática (HÄUSSINGER *et al.*, 2002; CULLEN, 2007; NORENBORG *et al.*, 2009). A importância no papel da hiperamonemia na encefalopatia hepática é amplamente aceita. A amônia é formada no trato gastrointestinal pela degradação bacteriana de amins, aminoácidos, purinas e uréia das proteínas consumidas na dieta. Em animais saudáveis a amônia é detoxificada no fígado pela conversão em uréia pelo ciclo da ornitina citrulina arginina uréia (ZACHARY, 2007). Com a perda de um ciclo efetivo de uréia o tecido nervoso metaboliza a amônia através de enzimas astrocíticas, como a glutamina sintetase e glutamina desidrogenase, formando glutamina, uma substância neurotóxica que é associada com as alterações degenerativas nos astrócitos e edema cerebral (BRUSILOW, 1986). Os astrócitos respondem à lesão na hiperamonemia com a formação de núcleo aumentado, marcadamente vesiculares e frequentemente alongados, são circundados por um halo claro, indicativo de tumefação celular e são chamados de astrócitos de Alzheimer tipo II (ZACHARY, 2007). Estas células mantêm a marcação imunohistoquímica positiva para o antígeno S-100 enquanto que a marcação se torna fraca ou ausente para GFAP. Isto sugere que a encefalopatia hepática causa uma perda seletiva nos filamentos GFAP. Os efeitos da amônia em culturas de astrócitos tem demonstrado alterações reativas, como proliferação de mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso, e alterações degenerativas, como redução de filamentos GFAP (SUMMERS; CUMMINGS; de LAHUNTA, 1995). A amônia e outros metabólitos também causam aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, levando a edema vasogênico e alteram a osmorregulação dentro do SNC, devido a alteração nos astrócitos (ZACHARY, 2007).

Em animais que desenvolvem encefalopatia hepática duas alterações celulares são reconhecidas no SNC: a primeira é a polimicrocavitação ou alteração esponjosa na substância branca que é causada pela vacuolização da bainha de mielina e a segunda são astrócitos com núcleos vacuolizados e claros (Alzheimer tipo II). Enquanto que na

maioria das espécies animais as duas ocorrem simultaneamente ou somente a primeira é visualizada, em equinos a segunda é observada com maior frequência (SUMMERS; CUMMINGS; de LAHUNTA, 1995).

Edema cerebral tem sido dividido em dois tipos básicos conforme sua origem, edema vasogênico e edema citotóxico. O mecanismo do edema cerebral vasogênico é um rompimento na barreira hematoencefálica que resulta em movimento dos constituintes plasmáticos, como água, íons, osmólitos orgânicos e proteínas para dentro do espaço perivascular extracelular. Este tipo de edema também pode estar acompanhado de tumefação celular envolvendo astrócitos. O edema citotóxico é caracterizado pelo acúmulo de fluido intracelularmente em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais (ZACHARY, 2007). É possível haver a união dos dois tipos de edema em uma determinada injúria ao sistema nervoso central (SUMMERS; CUMMINGS; de LAHUNTA, 1995).

As lesões encontradas no SNC na intoxicação por *Trema micrantha* em equinos podem lembrar aquelas observadas na leucoencefalomalácia eqüina, causada por *Fusarium verticillioides*. Entretanto, no caso da micotoxicose haverá um predomínio da malácia na lesão observada (HUMPHREYS, 1988; MORGAVI; RILEY, 2007). Adicionalmente, as lesões vasculares observadas na leucoencefalomalácia podem afetar vasos de maior calibre enquanto que as lesões observadas na intoxicação por *Trema micrantha* se restringem aos vasos de pequeno calibre (capilares).

6. CONCLUSÕES

As folhas de *Trema micrantha* se mostraram tóxicas para equinos em doses únicas a partir de 20 g/kg e a planta é palatável para esta espécie.

Os animais intoxicados tanto espontaneamente como experimentalmente apresentaram sinais clínicos, lesões macroscópicas, microscópicas e alterações bioquímicas características de insuficiência hepática aguda associada a encefalopatia hepática.

Os sinais clínicos característicos da intoxicação são apatia, desequilíbrios, dificuldade de deglutição, decúbito esternal, decúbito lateral, movimentos de pedalagem coma e morte.

Os principais achados macroscópicos são encontrados no fígado, que apresenta acentuação do padrão lobular e no encéfalo, onde são visualizadas áreas amareladas características de edema.

Os achados histopatológicos característicos são a necrose hepatocelular, que pode variar de centrolobular à massiva e no encéfalo são encontrados astrócitos Alzheimer tipo II e edema perivascular.

Os animais intoxicados apresentam aumento na atividade sérica da enzima gama glutamil transferase e dos níveis séricos de amônia e diminuição da glicemia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADYLAK, S.F. Coagulation disorders and liver disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 87-93, 1988.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. Fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.3, p. 147-153, 2008.
- BRUSILOW, S.W. Hepatic encephalopathy. **The New England Journal of Medicine** v.314, p.786-787. 1986.
- CANELLA, C.F.C.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Sessea brasiliensis* Toledo em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 333-340, 1968.
- CASTELLANI, E.D.; AGUIAR, I.B. Preliminary conditions for germination of *Trema micrantha* (L.) Blume seeds. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** , v.2, p. 80-83. 1998.
- CATTANI, C.S.; COLODEL, E.M.; TRAVERSO, S.D.; CORREA, A.M.R.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 31-34, 2004.
- CHAULET, J.H.F.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental por *Sessea brasiliensis* (Solanaceae) em bovinos, ovinos e caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 71-84, 1990.
- COLLAZO, L.; RIET-CORREA, F. Experimental intoxication of sheep and cattle with *Wedelia glauca*. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 200-203, 1996.
- COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; PILATI, C. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 31-38, 2000.
- COLODEL, E.M.; TRAVERSO, S.D.; SEITZ, A.L.; CORREA, A.M.R; OLIVEIRA, F.N.; DRIEMEIER, D.; GAVA, A. Spontaneous poisoning by *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) in cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 3, p. 147-148, 2003.
- CULLEN, J.M. Liver, Biliary System and Exocrine Pancreas. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. (ed.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 4 ed. Mosby Elsevier, St. Louis, pp 393-461. 2007.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht, a causa de mortandades em bovinos no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.4, p.165-193, 1969.

- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; PURISCO, E. *Vernonia molissima*, planta tóxica responsável por mortandades de bovinos no Sul de Mato Grosso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 11, p. 49-58, 1976.
- DRIEMEIER, D.; IRIGOYEN, L.F.; LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M.; BARROS, C.S.L. Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 12-18, 1999.
- GAVA, A.; BARROS, C. S. L. *Senecio* spp. poisoning of hoses in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p.36-40, 1997.
- GAVA, A.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental por *Vernonia molissima* (Compositae) em ovinos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.2, p. 33-41, 1987.
- GAVA, A.; STOLF, L.; PILATI, C.; NEVES, D.S.; VIGANÓ, L. Intoxicação por *Cestrum corymbosum* var. *hirsutum* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.11, n.3/4, p.71-74, 1991.
- GAVA, A.; STOLF, L.; VARASCHIN, M.S.; NEVES, D.S.; TIGRE, A.P.; LESSMANN, F. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.4, p.117-120, 1996.
- HÄUSSINGER D.; SCHLISS, F.; KIRCHEIS, G. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. V.17, p.256-259. 2002.
- HILL, B.D.; WILLS, L.D.; DOWLING, R.M. Suspected poisoning of horses by *Trema aspera* (poison peach). **Australian Veterinary Journal**, v.62, p.107-108. 1985.
- HUMPHREYS, D.J. **Veterinary Toxicology**. 3 ed. Baillière Tindall, London, pp 222-309. 356p. 1988.
- JACKSON, A.R.B.; McINNES, A.; FALCONER, I.R.; RUNNEGAR, M.T.C. Clinical and Pathological Changes in Sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 102-113, 1984.
- KISSMANN, K.G; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. 2 ed. Tomo III. BASF, São Bernardo do Campo, SP. pp.643-644, 723p. 2000
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3 ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa, SP. pp. 581, 339p. 2000.
- LORETTI, A.P.; BEZERRA, P.S.; ILHA, M.R.S.; BARROS, S.S.; BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.2, p.71-78, 1999.
- MENDEZ, M. D. C.; SANTOS, R. C.; RIET-CORREA, F. Intoxication by *Xanthium cavanillesii* in cattle and sheep in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v.40, n.3, p.144-147, 1998.

- MORGAVI, D.P.; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p.201-212. 2007
- MULHEARN, C.R. Poison peach (*Trema aspera*): a plant poisonous to stock. **Australian Veterinary Journal**, v.18, p.68-72. 1942.
- NOBRE, V.M.T.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J.M.; TABOSA, I.M.; VASCONCELOS, J.S. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. **Toxicon**, v. 45, p. 347-352, 2005.
- NOBRE, V.M.T.; RIET-CORREA, F.; FILHO, J.M.B.; DANTAS, A.F.M.; TABOSA, I.M.; VASCONCELOS, J.S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.3, p.132-143, 2004.
- NORENBERG M.D.; RAMA RAO K.V.; JAYAKUMAR A.R. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. **Metabolic Brain Disease**. v. 24, p. 103-117. 2009.
- OELRICHS, P.B. Isolation and purification of trema toxin from *Trema aspera*-d inst adsorption chromatography inst thin layer chromatography. **Phytochemistry**, v.7, p.1691-1693. 1968.
- PEIXOTO, P. V., BRUST, L. A .C., DUARTE, M.D., FRANÇA T.N., DUARTE V.C. & BARROS C.S. *Cestrum laevigatum* poisoning in goats in southeastern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 13-14, 2000.
- PIO-CORREA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. vol. II. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, GB, Brasil, pp.439. 1984.
- RAPOSO, J. B. ; MÉNDEZ, M.D. ; RIET-CORREA, F. ; ANDRADE, G.B. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 132-135, 1998.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3 ed. vol 2. Ed. Pallotti, Santa Maria, pp 99-221. 2007.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Introdução ao Estudo das Plantas Tóxicas in: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicação por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos**. Ed. Hemisfério Sul Do Brasil. Pelotas, RS. 1993.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 111-115, 1986.
- SCHOENFELDER, T.; CIRIMBELLI, T.M.; CITADINI-ZANETTE, V. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.456-459. 2006.

- STALKER, M.J.; HAYES, M.A. Liver and biliary system. In: MAXIE, M.G. (ed.) **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5.ed. vol. 2. Elsevier, St Louis, pp.297-381. 2007.
- SUMMERS, A.B.; CUMMINGS, J.F.; de LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**, Mosby, St Louis, pp 210-211. 1995.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação de bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 4, p. 143-147, 1982.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Helianthus, Rio de Janeiro, RJ. 310p. 2000.
- TRAVERSO, S.D.; COLODEL, E.M.; LORETTI, A.P.; CORRÊA, A.M.R.; DRIEMEIER, D. Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. **Ciência Rural**, v.33, p.133-136. 2003.
- TRAVERSO, S.D.; CORREA, A.M.R.; SCHMITZ, M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.211-216. 2004.
- TRAVERSO, S.D.; DRIEMEIER, D. Experimental *Trema micrantha* (Ulmaceae) poisoning in rabbits. **Veterinary and Human Toxicology**, v.42, p.301-302. 2000.
- TRAVERSO, S.D.; ZLOTOWSKI, P.; GERMER, M.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Spontaneous poisoning by *Trema micrantha* (Ulmaceae) in goats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 22, p. 207-210, 2005.
- TRUEMAN, K.F.; POWELL, M.W. Suspected poisoning of camels by *Trema tomentosa* (poison peach). **Australian Veterinary Journal**, v.68, p.213-214. 1991.
- VASQUEZ, Y.C. *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae): a promising neotropical tree for site amelioration of deforested land. **Agroforestry Systems**, v.40, p.97-104. 1998.
- ZACHARY, J.F. Sistema Nervoso. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. (ed.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 4 ed. Mosby Elsevier, St. Louis, pp 393-461. 2007