

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

CAMILA BLANCO POHL

USO DA TROPONINA I E C NO AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO DE INTOXICAÇÃO POR
ANTIBIÓTICOS IONÓFOROS EM EQUINOS

Porto Alegre

2021

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

USO DA TROPONINA I E C NO AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO DE INTOXICAÇÃO POR
ANTIBIÓTICOS IONÓFOROS EM EQUINOS

Aluna de mestrado: Camila Blanco Pohl

**Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre junto ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.**

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Coorientador: Prof. Dr. Welden Panziera

Porto Alegre

2021

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Pohl, Camila

Uso da troponina I e C no auxílio do diagnóstico de intoxicação por antibióticos ionóforos em equinos / Camila Pohl. -- 2021.

37 f.

Orientador: David Driemeier.

Coorientador: Welden Panziera.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Antibióticos ionóforos. 2. Cardiomiopatia tóxica. 3. Patologia. 4. Troponina. 5. Imunohistoquímica. I. Driemeier, David, orient. II. Panziera, Welden, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAMILA BLANCO POHL

**USO DA TROPONINA I E C NO AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO DE INTOXICAÇÃO POR
ANTIBIÓTICOS IONÓFOROS EM EQUINOS**

Aprovada em 22 de fevereiro de 2021

APROVADA POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lucia Pereira Schild

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Sonne

AGRADECIMENTO

Aos meus pais e irmã, Maria Alice, Raul e Marina pelo apoio incondicional, educação, amor, incentivo e por sempre estarem presentes nas minhas escolhas. A minha avó Hildegard pelo apoio, incentivo, ajuda e por ser um dos meus maiores exemplos dentro da vida acadêmica.

Em especial, quero agradecer a minha família de Porto Alegre, a Adriane, Antônio, Maria Fernanda, Maria Antônia e Cacau, por sempre estarem de braços abertos para me receber, escutar, incentivar, dar apoio, alegrar meus dias difíceis, por receber notícias estranhas como: estou fazendo necropsia de uma baleia, de um elefante.... E ainda vibrar com isso, como se não achassem horrível.

Aos “Migles”, Bianca Cecco, Fernada Cony, Franciéli Molossi, Jacqueline Raiter, Júlia Wronski, Luan Henker e Marina Lorenzett, pelo acolhimento, pelas ajudas, conversas, risadas, companheirismo, descontrações, diários, por me levarem ao Beira Rio (mais de uma vez, mesmo eu sendo a pé frio), por serem meu ombro amigo, e por tornar esses dois anos mais fáceis. A Marcia Hammerschmitt, que mesmo me dando medo no início, se tornou uma pessoa que não mediu esforços para ajudar, dar conselhos, ser parceira de mates, e ser a “guia turística” das saídas a campo para o lado de Lajeado. A Yasmin Daoualibi, por ser essa pessoa maravilhosa, com uma leveza inexplicável, que sempre esteve ao meu lado. Vou sentir muita falta de vocês.

A toda a equipe do Setor de Patologia Veterinária (SPV), pelo comprometimento e organização, em especial ao meu orientador Prof. David Driemeier e ao meu coorientador Prof. Welden Panziera pelas oportunidades, ensinamentos, pela confiança e experiências tanto profissionais quanto pessoais. A Prof^a. Luciana Sonne e ao Prof. Saulo Petinatti Pavarini por todos os ensinamentos, pelas risadas e ajudas durante o período de estágio e mestrado no SPV.

Aos meus queridos orientadores de Graduação na Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Prof. José Osvaldo Jardim Filho, por se o meu maior incentivador a seguir nas áreas de patologia e toxicologia, além de ser um grande amigo, sempre foi aquele professor que conhecia aluno por aluno, se preocupava com cada um, sempre disposto a conversar e ajudar, uma inspiração pessoal e profissional. Ao Prof. João Cesar Dias Oliveira e a Prof^a. Marta Lizandra do Rêgo Leal pela confiança e todas as oportunidades, experiências e ensinamentos durante a minha graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado. E por fim, a Deus, por tudo que eu consegui conquistar até aqui, todas as oportunidades que vieram e que estão por vir.

Muito Obrigada!!!

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”

Augusto Cury

RESUMO

Doenças cardíacas são frequentemente observadas em equinos e envolvem diversas alterações congênitas e adquiridas. Dentre as condições adquiridas, pode-se destacar a intoxicação por antibióticos ionóforos (AI). Diversos relatos têm sido documentados sobre esta intoxicação em equinos, nos quais são descritas que as principais alterações morfológicas observadas incluindo cardiomiopatia e miopatia degenerativas graves. Os AI são substâncias amplamente utilizadas na medicina veterinária em animais de produção, e visam o controle de coccidiose, redução de cetose e estimulam o crescimento e ganho de peso. Entre os ionóforos, os mais utilizados são a monensina, salinomicina, narasina e lasalocida. Em alguns casos, as lesões cardíacas induzidas pelo consumo de AI são hiperagudas ou agudas, e as alterações morfológicas são mínimas ou inexistentes ao exame histopatológico. Com isso, o objetivo do presente estudo foi realizar a avaliação sérica da troponina cardíaca I (cTnI) e da técnica de imuno-histoquímica anti-troponina C (IHC) (anti-cTnC), como ferramenta diagnóstica para lesões cardíacas em equinos intoxicados espontaneamente por salinomicina. Sete equinos foram afetados, com evolução clínica de seis a 72 horas. Destes, quatro foram submetidos à necropsia e três se recuperaram. As principais lesões morfológicas observadas foram cardiomiopatia e miopatia necrótica. A imuno-histoquímica anti-cTnC foi realizada em amostras selecionadas de tecido cardíaco dos quatro equinos submetidos à necropsia. Em todos os casos foi observada diminuição da expressão de cTnC no citoplasma dos cardiomiócitos. Amostras de soro de seis equinos foram submetidas à dosagem de troponina cardíaca I, sendo os valores mais altos observados, principalmente, em equinos que apresentavam lesões histológicas cardíacas mais graves. A detecção sérica de cTnI e IHC anti-cTnC podem ser consideradas bons marcadores para determinação de lesão cardíaca em equinos intoxicados com salinomicina com evolução clínica de 48 horas ou mais.

Palavras chaves: antibióticos ionóforos, doença de equinos, cardiomiopatia tóxica, imuno-histoquímica, salinomicina, troponina sérica.

ABSTRACT

Heart disease is often observed in horses and involves several congenital and acquired disturbances. A significant acquired myocardial degeneration in horses is the poisoning by ionophore antibiotics (IA). Several reports have been documented on this poisoning in horses, in which they describe that the main morphological changes observed include cardiomyopathy and severe degenerative myopathy. IA are widely used in veterinary medicine in breeding horses aiming to control coccidiosis, reduce ketosis and stimulate growth and weight gain. Among the ionophores, the most used are monensin, salinomycin, narasin, and lasalocid. Among the ionophores, the most used are monensin, salinomycin, narasin and lasalocida. In some cases, cardiac lesions induced by IA consumption are hyperacute or acute, and morphological changes are minimal or absent. Therefore, this study aimed to evaluate the serum levels of cardiac troponin I (cTnI) and the anti-troponin C immunohistochemistry (IHC) technique (anti-cTnC) as a diagnostic tool for cardiac injuries in horses spontaneously poisoned by salinomycin. Seven horses were affected by a disease lasting for 6-72 hours. Three horses recovered. The primary morphological lesions reported in the four necropsied horses that died spontaneously were degeneration and necrosis of myocardium and skeletal muscle. A drop occurred in the expression in the cytoplasm of cardiomyocytes measured in the four necropsied horses by immunohistochemistry using anti-cTnC in selected samples of cardiac tissue of all four necropsied. A decreased in cTnC expression in the cytoplasm of cardiomyocytes was noticed in all four necropsied horses. Samples of serum from six horses tested for cardiac troponin I levels; the most expressive values were mainly in horses with more severe cardiac histological lesions. Serum determination of cTnI and IHC anti-cTnC can be considered useful markers to determine cardiac lesions in horses intoxicated with salinomycin with clinical evolution of 48 hours or more.

Keywords: ionophores antibiotics, equine diseases, toxic cardiomyopathy, immunohistochemistry, salinomycin, serum troponin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Intoxicação por antibióticos ionóforos	12
2.1.1 Epidemiologia	13
2.1.2 Sinais Clínicos	14
2.1.3 Patologia.....	15
2.1.4 Diagnóstico	15
2.1.5 Diagnósticos Diferenciais	17
ARTIGO.....	18
3. CONCLUSÃO.....	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui atualmente a quarta maior população de equinos do mundo, com cerca de 5,8 milhões de animais, atrás apenas dos Estados Unidos da América, México e China (FAO, 2014; BRASIL, 2019). O Rio Grande do Sul, possui a segunda maior população de equinos com cerca de 520.000 animais (BRASIL, 2019). A equinocultura é um ramo economicamente importante para a agropecuária brasileira e a atividade movimenta cerca de 16 bilhões de reais ao ano e emprega aproximadamente 600.000 pessoas direta ou indiretamente (BRASIL, 2007).

Estudos sobre causas de morte ou razões para eutanásia em equinos demonstram que a intoxicação por antibióticos ionóforos (AI) geralmente está presente, destacando a importância da doença para a espécie (PIEREZAN *et al.*, 2009; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014). Os AI são produzidos por diversas linhagens de *Streptomyces*, e são utilizados com frequência desde 1970 em animais de produção, como aves e bovinos, para controlar coccidiose, reduzir cetose, estimular crescimento e ganho de peso (NICODEMO, 2001; COOPER; VALENTINE, 2016; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017). Os AI mais utilizados são a monensina, salinomicina, narasina e lasalocida (COOPER; VALENTINE, 2016; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

As intoxicações geralmente ocorrem por erro na formulação da ração, utilização de ração em espécies não alvo, uso em associação com alguns medicamentos que potencializam seus efeitos e ingestão de quantidades excessivas por animais dominantes (DOONAN *et al.*, 1989; BEZERRA *et al.*, 1999; PAVARINI *et al.*, 2011; COOPER; VALENTINE, 2016; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017). Os equinos são altamente sensíveis a esses compostos e a utilização nessa espécie é contraindicada. Em casos de intoxicação, as principais alterações morfológicas observadas são graves cardiomiopatias e miopatias necróticas (DOONAN *et al.*, 1989; BEZERRA *et al.*, 1999; PAVARINI *et al.*, 2011). Em alguns casos, as lesões cardíacas induzidas pelo consumo de AI são hiperagudas ou agudas, e as alterações morfológicas são mínimas ou inexistentes ao exame histopatológico (COOPER; VALENTINE, 2016).

Nesse contexto, o emprego de técnicas complementares de diagnóstico para esta intoxicação é de extrema importância. As troponinas cardíacas (cTn), constituídas por subunidades C, T e I, apresentam alta sensibilidade e especificidade para lesões do miocárdio e são consideradas biomarcadores de escolha para detecção de lesão celular cardíaca em humanos

e até mesmo em animais (O'BRIEN, 2008; WELLS; SLEEPER, 2008; ROSSI *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado bons resultados na correlação entre o aumento sérico de troponinas e alterações cardíacas em equinos (CORNELISSE *et al.*, 2000; SCHWARZWALD; HARDY; BUCCELLATO, 2003; DIVERS *et al.*, 2009; NATH *et al.*, 2012; RUBY *et al.*, 2018), assim como o emprego da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) anti-cTn na detecção tecidual de lesões cardíacas em diferentes espécies de animais (FISHBEIN *et al.*, 2003; TUNCA *et al.*, 2008; KARAPINAR *et al.*, 2012; PAVARINI *et al.*, 2012; BANDINELLI *et al.*, 2014). No entanto, as informações científicas que avaliam a concentração sérica de troponinas cardíacas e o uso de IHQ anti-cTn em equinos intoxicados naturalmente por antibióticos ionóforos são escassas.

Esse estudo tem por objetivo demonstrar o uso da dosagem sérica de troponina cardíaca I (cTnI) e da técnica de IHQ anti-troponina C (anti-cTnC), como ferramenta diagnóstica de lesões cardíacas em equinos intoxicados espontaneamente por salinomicina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Intoxicação por antibióticos ionóforos

Estudos de levantamento realizados no Rio Grande de Sul (RS) sobre causas de morte ou razões para eutanásia em equinos, pode-se observar que a intoxicação por AI sempre está presente, o que demonstra sua importância para esta espécie (PIEREZAN *et al.*, 2009; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014). Os antibióticos ionóforos são produzidos por diversas linhagens de *Streptomyces*, e são utilizados com frequência desde 1970 em sistemas de produção, principalmente, de aves e de bovinos, para controlar coccidiose, reduzir cetose, estimular crescimento e ganho de peso (NICODEMO, 2001; COOPER; VALENTINE, 2016; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017). Os AI mais utilizados na medicina veterinária são a monensina, salinomomicina, narasina e lasalocida (COOPER; VALENTINE, 2016; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Os AI formam complexos lipossolúveis dinamicamente reversíveis com uma variedade de cátions (NOVILLA, 1992; RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007; NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009) e são classificados como monovalentes ou bivalentes, dependendo de sua afinidade. Os AI monovalentes incluem monensina (maior afinidade com sódio [Na⁺] do que potássio [K⁺]), salinomomicina (maior afinidade com K⁺ do que Na⁺), e narasina (se liga a K⁺). Lasalocida é considerado um AI divalente, que se liga ao cálcio (Ca²⁺) e ao magnésio (Mg²⁺) (PRESSMAN, 1976; RUSSELL; STROBEL, 1989). Esses cátions alteram a permeabilidade das membranas e facilitam o influxo de íons para as células, comprometendo assim o equilíbrio osmótico e eletrolítico (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007; NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009; GUPTA, 2012). A translocação de íons e o rompimento de gradientes iônicos são responsáveis pelos efeitos terapêuticos e tóxicos dos ionóforos (PRESSMAN, 1965; PRESSMAN, 1968). A ação terapêutica ocorre devido a ação dos ionóforos sobre a membrana celular das bactérias ruminais, coccídeos ou fungos patogênicos, o que resulta na morte destes patógenos (PRESSMAN, 1976; RUSSELL; STROBEL, 1989). Nos casos de intoxicação, a ação dos antibióticos ionóforos é semelhante, porém ocorre nas membranas celulares (ALPHARMA, 2002). Sugere-se que a lesão muscular está relacionada ao influxo celular excessivo de cálcio e sódio, desequilíbrio osmótico e alteração do pH intracelular (BEZERRA *et al.*, 2000; ALEMAN *et al.*, 2007; NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009). Estes

distúrbios causam alterações morfológicas graves caracterizadas por cardiomiopatia e miopatia degenerativas (DOONAN *et al.*, 1989; BEZERRA *et al.*, 1999; BARROS, 2007; PAVARINI *et al.*, 2011). Normalmente, a morte de equinos intoxicados por AIs está relacionada com a insuficiência cardíaca devido a cardiomiopatia degenerativa (PAVARINI *et al.*, 2011).

2.1.1 Epidemiologia

As intoxicações por AI geralmente ocorrem de maneira acidental, por consequência da identificação errada de recipientes e sacos de ração, erro na formulação da ração ou mistura não homogênea, utilização de ração em espécies não alvo (por exemplo, uso na alimentação de equinos de rações preparadas para aves ou bovinos), uso em associação com alguns medicamentos que potencializam seus efeitos (cloranfenicol, tiamulina, eritromicina, sulfonamidas, triacetiloleandomicina e glicosídeos) e ingestão de quantidades excessivas por animais dominantes (DOONAN *et al.*, 1989; MORGAN; STAVENBORN, 1991; NOVILLA; OWEN; TODD, 1994; BEZERRA *et al.*, 1999; PAVARINI *et al.*, 2011; COOPER; VALENTINE, 2016; CONSTABLE *et al.*, 2016; NOVILLA; MCCLARY; LAUDERT, 2017).

Todas as espécies de animais são sensíveis aos efeitos tóxicos dos antibióticos ionóforos, entretanto, os equinos possuem maior susceptibilidade e a utilização desses compostos nessa espécie é contraindicada (ROLLINSON; TAYLOR; CHESNEY, 1987; DOONAN *et al.*, 1989; BEZERRA *et al.*, 1999; ALEMAN *et al.*, 2007; PAVARINI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2019). As intoxicações natural e experimental foram descritas em diversas espécies de animais, como aves (BECK; HARRIES, 1979; PAVARINI *et al.*, 2011), bovinos (SCHWEITZER *et al.*, 1984; GAVA *et al.*, 1997; WOUTERS; WOUTERS; BARROS, 1997a), ovinos (BOURQUE; SMART; WOBESER, 1986; WOUTERS; WOUTERS; BARROS, 1997b; FRANÇA *et al.*, 2009; RISSI; BARROS, 2010), cães (KARSAI *et al.*, 1990), bubalinos (ROZZA *et al.*, 2007), coelhos (SALLES; LOMBARDO; BARROS, 1994; LUCENA *et al.*, 2012) e suínos (MISKIMINS; NEIGER, 1996; ARMIÉN *et al.*, 1997). As doses tóxicas dos antibióticos ionóforos variam consideravelmente dependendo do tipo de ionóforo, da espécie e da categoria de animal. Para equinos, a salinomicina está entre os ionóforos que apresenta elevada toxicidade, com dose tóxica de 0,5mg/kg/peso corporal (PC). Para o composto monensina, a dose varia entre 2-3mg/kg/PC (HANSON; EISENBEIS; GIVENS, 1981; RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007). Para ovinos, a dose tóxica de monensina é de 12mg/kg/PC, para bubalinos,

considerada a espécie mais sensível a dose tóxica é 5gm/kg/PV, em ovinos varia entre 22-50 mg/kg/PC e para frangos esse mesmo AI possui dose tóxica de 200 mg/kg/PC. A narasina, para galinhas apresenta dose tóxica de 66mg/kg/PC e para suínos é de 6 mg/kg/PC (ARMIÉN *et al.*, 1997; RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007; ROZZA *et al.*, 2007). Em um surto de intoxicação por salinomicina em bovinos no Paraná a dose relacionada a doença foi de 21,3 mg/kg/PC (GAVA *et al.*, 1997).

2.1.2 Sinais Clínicos

O curso clínico da intoxicação por AI em animais pode variar de hiperagudo, agudo ou até mesmo crônico e está relacionado, principalmente, a espécie acometida, tipo de ionóforo, dose ingerida e o tempo de exposição (ALEMAN *et al.*, 2007). Em equinos, os sinais clínicos iniciam comumente dois a cinco dias após a exposição, com evolução de aproximadamente seis a 72 horas. Na apresentação superaguda da intoxicação, a evolução clínica é de até 18 horas, e os animais frequentemente são encontrados mortos em consequência da insuficiência cardíaca, sem a apresentação de sinais clínicos. O curso clínico em equinos também pode ser agudo, o qual dura aproximadamente 18 horas a quatro dias e os animais apresentam sinais clínicos caracterizados por inquietação, dificuldade respiratória, diarreia, congestão da mucosa, sudorese, mioglobínúria, febre, disritmias cardíacas, taquicardia, dificuldade em se levantar, cólica, marcha rígida, andar cambaleante e decúbito final (ALEMAN *et al.*, 2007; PAVARINI *et al.*, 2011; DECLOEDT *et al.*, 2012; CONSTABLE *et al.*, 2016). Ocasionalmente, os equinos que sobrevivem a estas fases, podem desenvolver o curso clínico crônico da doença (CONSTABLE *et al.*, 2016). Em bovinos, o período entre a ingestão e o aparecimento dos sinais clínicos varia de 18 horas a quatro dias. Pode-se observar anorexia, diarreia, tremores musculares, fraqueza, taquicardia e atonia ruminal, levando a morte por insuficiência cardíaca aguda (RODER, 2011; CONSTABLE *et al.*, 2016). Os animais que sobrevivem geralmente desenvolvem insuficiência cardíaca congestiva, como edema de peito, ascite, ingurgitamento e pulso positivo da jugular (GAVA *et al.*, 1997; DE LA CRUZ-HERNANDES *et al.*, 2012; CONSTABLE *et al.*, 2016). Em ovinos, a intoxicação pode ser observada entre poucas horas a alguns dias (2-3 dias) após a ingestão do antibiótico ionóforo. As principais manifestações são anorexia, diarreia, estase ruminal, incoordenação, ataxia, mioglobínúria, dispneia, convulsões e hiperestesia (HOSSEINI *et al.*, 2013; CONSTABLE *et al.*, 2016).

2.1.3 Patologia

As lesões associadas à intoxicação por antibióticos ionóforos são caracterizadas, principalmente, por miopatia e cardiomiopatia degenerativas com intensidades variáveis em todas as espécies. Entretanto, nos casos hiperagudos, as lesões macroscópicas nem sempre são evidentes. As musculaturas esquelética e cardíaca apresentam áreas pálidas ou branco-amareladas focais a focalmente extensas, entremeadas a musculatura normal. As alterações cardíacas podem estar acompanhadas de congestão, edema pulmonar, hidropericárdio e hemorragias epicárdica e endocárdica (BEZERRA *et al.*, 1999; ROZZA *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2009; RISSI; BARROS, 2010; PAVARINI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2019). Bovinos que morrem com insuficiência cardíaca congestiva crônica, geralmente apresentam edema subcutâneo de declive na região peitoral, edema pulmonar, hidropericárdio, ascite e fígado com aspecto de noz-moscada (GAVA *et al.*, 1997).

Os achados histológicos mais característicos da intoxicação são lesões degenerativas necróticas nas musculaturas esquelética e cardíaca. No entanto, nos casos hiperagudos ou agudos, essas alterações podem ser mínimas e de difícil detecção (BARROS, 2007). No coração, observa-se necrose individual ou de múltiplos cardiomiócitos. Na musculatura esquelética, as fibras necróticas apresentam-se tumefeitas, com hipereosinofilia e perda das estriações (necrose hialina). Além disso, fibras podem demonstrar fragmentação com aspecto de flocos (necrose flocular) e mineralização. Em alguns casos mais prolongados, ocorrem processos regenerativos, fibrose e infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente, de macrófagos (BEZERRA *et al.*, 2000; PAVARINI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2019).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da intoxicação por antibióticos ionóforos deve ser realizado por meio da associação dos achados epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos e pela detecção do composto no alimento ingerido pelos animais. Os dados epidemiológicos são importantes para a suspeita da intoxicação. Durante a necropsia, recomenda-se a coleta de fragmentos de músculos esqueléticos e cardíaco em formalina a 10% para a análise histológica. É importante também a coleta de fragmentos de outros órgãos para descartar diagnósticos diferenciais. Várias

amostras da alimentação devem ser enviadas para análise e confirmação do diagnóstico, que normalmente é realizada pela determinação (por cromatografia) qualitativa (tipo específico de ionóforo) e quantitativa de ionóforo (BARROS, 2007).

Exames bioquímicos complementares podem auxiliar no diagnóstico da intoxicação. Normalmente, os exames laboratoriais demonstram aumentos nos níveis séricos de creatina fosfoquinase (CK), LDH, fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST) (ROZZA *et al.*, 2006; ALEMAN *et al.*, 2007; RAJAIN *et al.*, 2009; OMIDI *et al.*, 2010; RODER, 2011; PAVARINI *et al.*, 2011; HOSSEINI *et al.*, 2013; CONSTABLE *et al.*, 2016). No entanto, os resultados podem variar por consequência de fatores individuais. Além disso, essas enzimas estão presentes em diversos tecidos, como musculatura esquelética e tecido hepático, e a elevação dos níveis séricos pode não ser específica para intoxicação por ionóforos (CONSTABLE *et al.*, 2016). Avaliação do sistema cardiovascular é, também, importante para os animais intoxicados por AI, mas representa um desafio (VARGA *et al.*, 2009). Eletrocardiogramas e doppler são úteis em alguns casos, porém em medicina veterinária estas técnicas de diagnóstico não são muito utilizadas devido ao custo elevado e por apresentarem vários fatores que podem influenciar na avaliação (ZUCCA *et al.*, 2008; VARGA *et al.*, 2009; DECLOEDT *et al.*, 2012; ROSSI *et al.*, 2014).

Outra ferramenta proposta, e que pode auxiliar no diagnóstico de lesões cardíacas agudas em animais, inclui o uso das troponinas cardíacas (cTn) (DEFRANCESCO *et al.*, 2002; OYAMA; SISSON, 2004; GODOY *et al.*, 2016). As troponinas são utilizadas na medicina humana desde os anos 90 e auxiliam no diagnóstico de pacientes com suspeita de lesão miocárdica (BODOR *et al.*, 1992; LARUE *et al.*, 1993; ALPERT *et al.*, 2000; DEFRANCESCO *et al.*, 2002; OYAMA; SISSON, 2004; GODOY *et al.*, 2016). As cTn são proteínas globulares que, juntamente com a tropomiosina e a actina, formam parte do filamento fino do aparelho contrátil no músculo estriado (FILATOV *et al.*, 1999). Fazem parte de um complexo regulador de contração e relaxamento das fibras musculares, dependentes da concentração de cálcio (EBASHI; ENDO, 1968; MARGOSSIAN; COHEN, 1973; FILATOV *et al.*, 1999).

Três proteínas constituem o complexo das troponinas (troponinas C, T e I) e apresentam alta sensibilidade e especificidade para lesões do miocárdio. Estas também estão presentes em todas as espécies de mamíferos (O'BRIEN, 2008; WELLS; SLEEPER, 2008; ROSSI *et al.*, 2014) e quando há dano na integridade da membrana celular do miocárdio são liberadas. Estudos realizados até o momento têm demonstrado bons resultados na correlação entre o

aumento sérico de troponinas e alterações cardíacas em equinos (CORNELISSE *et al.*, 2000; SCHWARZWALD; HARDY; BUCCELLATO, 2003; DIVERS *et al.*, 2009; HICKMAN *et al.*, 2010; NATH *et al.*, 2012; RUBY *et al.*, 2018) e demais espécies (KARAPINAR *et al.*, 2012; BUCZINSKI; BÉLANGER, 2010; RICCHIUTI *et al.*, 1998). O emprego da técnica de imunohistoquímica (IHQ) anti-cTn na detecção de lesões cardíacas também vêm demonstrando bons resultados em diferentes espécies de animais (RICCHIUTI *et al.*, 1998; FISHBEIN *et al.*, 2003; TUNCA *et al.*, 2008; BUCZINSKI; BÉLANGER, 2010; KARAPINAR *et al.*, 2012; PAVARINI *et al.*, 2012; BANDINELLI *et al.*, 2014). Em alguns casos, as lesões cardíacas induzidas pelo consumo de antibióticos ionóforos são difíceis de serem constatadas ao exame microscópico (COOPER; VALENTINE, 2016). Nesse contexto, o emprego de técnicas complementares de diagnóstico é importante e a determinação sérica de troponinas cardíacas e o uso da técnica de imunohistoquímica anti-troponina C (anti-cTnC) podem auxiliar na acurácia do diagnóstico da intoxicação em animais.

2.1.5 Diagnósticos Diferenciais

Entre os diagnósticos diferenciais da intoxicação por AI em equinos deve-se destacar as doenças que cursam com miopatia e/ou cardiomiopatia, como rabdomiólise de esforço (CONSTABLE *et al.*, 2016), intoxicações por *Senna occidentalis* (IRIGOYEN; GRAÇA; BARROS, 1991) e *Nerium oleander* (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007), e deficiência de vitamina E e selênio (NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009).

Outros diagnósticos diferenciais que devem ser considerados, são as doenças neurológicas de evolução aguda por apresentarem sinais clínicos que podem ser confundidos com os encontrados na intoxicação por AI, como incoordenação, dificuldade em se levantar, marcha rígida, andar cambaleante e decúbito. Dentre essas doenças, as principais observadas no sul do Brasil são raiva (BASSUINO *et al.*, 2016), intoxicação por *Trema micrantha* (PAVARINI *et al.*, 2013; LORENZETT *et al.*, 2018), tétano (REICHMANN; LISBOA; ARAUJO, 2008), leucoencefalomalácia (RIET-CORREA; SOARES; MÉNDEZ, 1998; RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007; ECHENIQUE *et al.*, 2019), encefalites (FIGUEIREDO, 2007), encefalomielite (WEIBLEN, 2007) e traumas (PIEREZAN *et al.*, 2009; CONSTABLE *et al.*, 2016).

ARTIGO

Neste item será apresentado o artigo “Troponin I and C in the diagnostics of ionophore intoxication in horses”, que será submetido para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira.

Troponin I and C in the diagnostics of ionophore intoxication in horses¹

Camila B. Pohl^{2*}, Bianca S. Cecco², Luan C. Henker², Marcele B. Bandinelli², Ronaldo M. Bianchi², Welden Panziera², Saulo P. Pavarini² and David Driemeier²

ABSTRACT.- Pohl C.B., Cecco B.S., Henker L.C., Bandinelli M.B., Bianchi R.M., Panziera W., Pavarini S.P. & Driemeier D. **Troponin I and C in the diagnostics of ionophores intoxication in horse.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, prédio 42505, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil. E-mail: cacabpohl@gmail.com

Ionophores are antibiotics frequently used in production animals. Among them, monensin, salinomycin, narasin, and lasalocid are the most common. The equine species is highly susceptible to ionophores poisoning. The present study aimed to analyze the serum use of cardiac troponin I (cTnI) and the anti-troponin C immunohistochemistry (IHC) technique (anti-cTnC) as a diagnostic tool for cardiac injuries in horses spontaneously poisoned by salinomycin. Seven horses were affected by a disease lasting for 6-72 hours. Three horses recovered. The primary morphological lesions reported in the four necropsied horses that died spontaneously were degeneration and necrosis of myocardium and skeletal muscle. Immunohistochemistry for anti-cTnC was performed in selected sections of the cardiac muscle from the equine submitted for necropsy. A decreased in cTnC expression in the cytoplasm of cardiomyocytes was noticed in all four necropsied horses. Samples of serum from six horses tested for cardiac troponin I levels; the most expressive values were mainly in horses with more severe cardiac histological lesions. Serum determination of cTnI and IHC anti-cTnC can be considered useful markers to determine cardiac lesions in horses intoxicated with salinomycin with clinical evolution of 48 hours or more.

INDEX TERMS: Equine diseases, salinomycin, toxic cardiomyopathy, immunohistochemistry, serum troponin.

RESUMO.- [Troponina I e C no auxílio do diagnóstico de intoxicação por ionóforos em equinos]

Ionóforos são antibióticos frequentemente utilizados em animais de produção. Dentre eles, os mais comuns são a monensina, salinomicina, narasina e lasalocida. A espécie equina é altamente suscetível à intoxicação por ionóforos. O objetivo do presente estudo foi realizar a avaliação sérica da troponina cardíaca I (cTnI) e da técnica de imuno-histoquímica anti-troponina C (IHC) (anti-cTnC), como ferramenta diagnóstica para lesões cardíacas em equinos intoxicados espontaneamente por salinomicina. Sete equinos foram afetados, com evolução clínica de seis a 72 horas. Destes, quatro foram necropsiados e três se recuperaram. As principais lesões morfológicas observadas foram degeneração e necrose do miocárdio e dos músculos esqueléticos. A imuno-histoquímica anti-cTnC foi realizada em amostras selecionadas de tecido cardíaco dos quatro equinos submetidos à necropsia. Em todos os casos foi observada diminuição da expressão de cTnC no citoplasma dos cardiomiócitos. Amostras de soro de seis equinos foram submetidas à dosagem de troponina cardíaca I. Os valores mais altos foram observados em equinos que apresentaram lesões histológicas cardíacas mais graves. A detecção sérica de cTnI e a IHC anti-cTnC podem ser consideradas bons marcadores para determinação de lesão cardíaca em equinos intoxicados com salinomicina com evolução clínica de 48 horas ou mais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doença de equinos, salinomicina, cardiomiopatia tóxica, imuno-histoquímica, troponina sérica.

INTRODUCTION

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, prédio 42505, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil. E-mail: cacabpohl@gmail.com *Corresponding author.

Ionophore antibiotics (IA) have been used in agriculture and animal production systems, such as poultry and cattle, to control coccidia, decrease ketosis, and increase animal growth and weight gain. Commonly used IA commonly used are monensin, salinomycin, narasin and lasalocid (O'Brien 2008, Cooper & Valentine 2016). Intoxication usually occurs as a result of an error in feed formulation, use to feed non-target, association with some drugs that enhance its effects, and ingestion of excessive amounts by dominant animals (Doonan et al. 1989, Bezerra et al. 1999, Bezerra et al. 2000, Pavarini et al. 2011, Cooper & Valentine 2016, Novilla et al. 2017). Horses are highly susceptible to IA, and their feed should not contain these additives. The main lesions reported are cardiomyopathy and necrotic myopathies (Doonan et al. 1989, Bezerra et al. 1999, Pavarini et al. 2011). Frequently, cardiac lesions induced by IA consumption are hyperacute and acute, leading to minimal or absent histopathological lesions, making essential the use of complementary diagnostic techniques (Cooper & Valentine 2016).

The correlation between the increase of the serum troponin and degenerative myocardiopathies in horses is part of several studies (Cornelisse et al. 2000, Schwarzwald et al. 2003, Divers et al. 2009, Nath et al. 2012, Ruby et al. 2018). The information on the use of histochemistry (IHC) to detect cardiac lesions in different species is also available (Fishbein et al. 2003, Tunca et al. 2008, Karapinar et al. 2012, Pavarini et al. 2012, Bandinelli et al. 2014). However, information on the serum concentration of cardiac troponin and IHC anti-cTn in naturally IA intoxicated horses is scarce. Therefore, the present clinical validation study aimed to analyze the use of serum cardiac troponin I (cTnI) and the immunohistochemistry anti-troponin C (anti-cTnC), as a diagnostic tool for cardiac injuries in horses spontaneously poisoned by ionophore antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

Clinical and epidemiological data were obtained directly with the stable owner on two on-site visits. Out of seven horses showing clinical signs of weakness, four horses underwent postmortem, histopathological and immunohistochemical examination. During the postmortem examination, samples of the main organs, including skeletal muscle (hind limb and forelimb) and cardiac fragments of right and left ventricles, plus right and left papillary muscles were collected, fixed in 10% buffered formalin, routinely processed for histopathology, and stained by hematoxylin and eosin (H&E). Microscopic lesions affecting the heart and skeletal muscles were recorded and graded as mild, moderate, and severe.

Immunohistochemical (IHC) analyses were performed on sections of the heart, using the peroxidase-labeled universal polymer method (MACH 4 HRP-Universal Polymer, Biocare Medical®, Pacheco, California, USA) for the monoclonal antibody Troponin C (Novo Castra®), dilution 1:40 in PBS (phosphate buffered saline). The antigen retrieval was performed in digital pressure cooker, pH9 TRIS EDTA buffer - 125°C for 3 minutes. Immunolabelling was visualized by using 3-amino-9-ethylcarbazole as chromogen (AEC romulin, Biocare Medical®, Pacheco, California, USA), and slides were counterstained with Harris hematoxylin. Myocardium fragments incubated with phosphate-buffered saline (PBS) instead of the primary antibody served as the negative controls. Myocardial fragments (bearing cardiomyocyte necrosis) from cattle intoxicated by *Amorimia exotopica* were used as a positive control. Immunolabeling was graded according to the decrease in labeling.

Samples of serum from six horses (Horses 2, 3, 4, 5, 6, and 7), were submitted to measure the concentration of cardiac troponin I (cTnI), 48 to 72 hours after the onset of clinical signs. The enzyme creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) of horses 5, 6, and 7 that showed clinical improvement after IA consumption, were also analyzed. The exclusion of Horse 1 from the biochemical analysis was due to severe autolytic changes. The horse's commercial feed was collected and forwarded to quantify monensin and salinomycin, using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, according to Official Methods of Analysis of AOAC International (Horwitz & Latimer 2005, Campbell & Nayeri 2006).

RESULTS

Epidemiology and clinical signs

The cases occurred in a property with overnight stables for horses in the municipality of Novo Hamburgo (29° 40' 40" S; 51° 7' 51" W), Rio Grande do Sul, Brazil. Seven horses were affected from a total of 42 that were on the property. The horse's identification and information are available in Table 1. All the horses were kept mostly indoors and fed a pre-dried base of oats (*Avena sativa*), ryegrass (*Lolium multiflorum*), and commercial feed. The stable owner reported a recent change to a different brand in the

commercial ration fed to the horses that present clinical signs five days later. At the onset, there were muscle weakness, locomotor difficulties, breathing distress, and lateral recumbency. Overall, the clinical course lasted approximately 6 to 72 hours. Of the seven affected horses, two died spontaneously (Equine 1 and 2), two were euthanized due to poor prognosis (Equine 3 and 4), and three recovered (Equine 5, 6, and 7). The commercial feed analysis revealed salinomycin in the concentration of 54,71 mg/kg (limite de quantificação 0,7 mg/kg), and monensin levels were below the quantification limit (limite de quantificação 1,40mg/kg) (Horwitz & Latimer 2005, Campbell & Nayeri 2006).

Gross and microscopic findings

Cardiac lesions observed during postmortem examination in the four horses submitted to necropsy were similar in all cases, with variation in severity among them. The lesions were multifocal to focally extensive pale areas in the myocardium (4/4) (Fig. 1), moderate hydropericardium (3/4), and petechiae in the epicardium (3/4). In the skeletal muscle, focally extensive pale areas were noticed, interspersed with normal musculature, both in appendicular and axial skeletons. These macroscopic changes were evident, mainly in the pelvic limbs, mostly on the gluteus muscle, and more pronounced in Equine 4.

Histologically, lesions on cardiac and skeletal muscles corresponded, respectively, to necrotic cardiomyopathy and myopathy. Cardiac alterations included individual and multifocal cardiomyocyte necrosis, characterized by a homogeneous, hypereosinophilic, shrunken cytoplasm, nuclear pyknosis, and occasional karyolysis. Multifocally, intracytoplasmic vacuoles, and myofibril fragmentation foci were noticed, associated with infiltrate of macrophages and mild fibroblastic proliferation (Figs. 2, 4, 6 and 7). Cardiac lesions were graded according to the severity in mild to moderate (Table 2). Horses with mild cardiac alterations (Equine 1 and 3), presented solely individual cardiomyocyte necrosis or small necrotic foci, e não havia infiltrado inflamatório. Horses with moderate cardiac alterations (Horse 2 and 4) exhibited accentuated necrosis of cardiomyocytes, associated with few number of macrophages and fibroblasts. Myopathy observed in the skeletal muscles was also variable in intensity (mild to moderate). Necrotic lesions were polyphasic and included isolated muscle fibers, or small foci characterized by myocyte hypereosinophilia, swelling and loss of striations (hyaline necrosis). Occasionally, there was fragmentation of myofibrils (floccular necrosis), associated with mild infiltrating macrophages.

Immunohistochemistry and serological results

A decreased cTnI expression in the cytoplasm of cardiomyocytes occurred in all cases. Areas histologically characterized for necrosis exhibited accentuated loss or absence of cytoplasmic labeling for cTnI (Figs. 3, 5, and 7). The absence of labeling frequently occurred in areas where cardiac lesions were most severe at microscopic examination. However, some areas without histologic lesions also exhibited a lack of labeling for cTnI. The anti-troponin I labeling was intense in the cytoplasm of intact cardiomyocytes from the cases and also in the cardiac fragments used as controls. Loss or reduction in cytoplasmic labeling in necrotic cells was graded in each horse as mild or moderate. Immunohistochemistry labeling and biochemical analysis are demonstrated in Table 2.

The serum concentration of cTnI was evaluated in six horses (2, 3, 4, 5, 6 and 7). The cTnI varied between 0.005 to 6.573 ng/mL (reference value: <0.004 ng/mL [Kraus et al 2010]). The results for the enzyme creatine kinase (CK), and aspartate aminotransferase (AST) were measured in horses 5, 6 and 7 are available on Table 2.

DISCUSSION

The diagnosis of ionophore poisoning in horses in this study was based on epidemiological, clinical, and laboratory findings added to the detection of salinomycin in the commercial feed ingested by the horses. Salinomycin is considered highly toxic to equines; however, naturally occurring cases are rarely reported (Aleman et al. 2007). Ionophore toxicosis in equines is usually related to the consumption of monensin through the ingestion of other species feed, e.g., cattle (Doonan et al. 1989, Bezerra et al. 1999, Pavarini et al. 2012). In the outbreak here described, the horses were fed with commercial feed exclusive for horses, leading to the hypothesis that a mistake in the feed formulation or problems in cleaning the manufacturer's equipment occurred, as already described in the literature in similar outbreaks (Doonan et al. 1989, Bezerra et al. 1999, Copper & Valentine 2016, Novilla et al. 2017).

The clinical course of IA poisoning is directly related to the consumed dose since extremely high doses can lead to death shortly after consumption, leading to minimal cardiac lesions (Bezerra et al. 1999). The use of IHC for troponin I in the present study was essential for the detection of the cardiac lesion in one

of the affected horses (Horse1), since it died with the acute course of the disease and serum evaluation of cTnI was not possible. In some species of domestic animals, IHC has been used as an auxiliary method of diagnosis in cardiac injuries (Fishbein et al. 2003, Tunca et al. 2008, Karapinar et al. 2012), including the diagnosis of acute cardiotoxic disease in cattle (Pavarini et al. 2012, Bandinelli et al. 2014). IHC is a tool that can be utilized, especially in cases in which it is not possible the serum troponin evaluation, or when the cardiac tissue is already fixed in formalin. Besides that, no data regarding the use of IHC anti-cTnC in salinomycin naturally intoxicated horses is available. However, the serum dosage of cTnI as an ancillary test for early detection of the cardiac lesion in horses may not be enough. This feature may be related to the kinetic liberation of troponin, which consists of two separated intracellular fractions inside the cardiomyocyte. Consequential to the acute cardiac lesion, a liberation of the cytosolic pool, which consists of only 2 to 4% of the cTn within the cell, resulting in an early increase of cTn in blood levels. This event is followed by a slower liberation of structurally bounded troponin, which results in a more long-lasting increase of cTn (Wells & Sleeper 2008, Rossi et al. 2014).

A correlation is suggested between the clinical evolution of the affected horses, the severity of the histologic lesion, the anti-cTnC labeling, and the serum values of cTnI. Equine with more prominent cardiac lesions and longer clinical course exhibited higher serum levels of cTnI, in addition to well-demarcated areas with decrease or absence of cTnC expression on IHC. Otherwise, horses that presented less extensive and mild cardiac lesions histologically, with shorter clinical evolution, exhibited mildly decreased areas of cTnC expression on IHC. Besides that, Equine 3 also presented decreased serum value for cTnI when compared to the other horses in this study. Similar data are described in an experimental study conducted with monensin intoxication in horses, which demonstrated an initial increase in serum concentrations of cTnI between 24 and 72 hours after consumption of the compound (Divers et al. 2009). In the same study, two horses that died within one week of exposure due to severe cardiac disease presented higher concentrations of cTnI (Divers et al. 2009). Besides, the serum concentration of cTnI can be proportional to the size of the cardiac lesion, as already noted in dogs (O'Brien et al. 2006), leading to the conclusion that troponin release may be directly related to the degree of myocardial injury.

In humans with myocardial infarction, cTn increases between 4 and 6 hours after the insult to the muscle, and peak values are obtained after 18 to 24 hours (O'Brien 2008, Wells & Sleeper 2008, Rossi et al. 2014). Similar data can be suggested in horses, since DNA sequence exhibits greater than 90% homology between human and equine cTnI (Rishniw & Simpson 2005). Another feature that must be considered includes the association between high cTnI levels and prognostic value of these levels in horses with cardiac disease (Nath et al. 2012). This is an interesting feature since one of the horses here described (Equine 6), presented an increase in cTnI, however, had clinical recovery, while Horse 3, which presented lower cTnI values evolved to death. A similar case is described in a study where a horse survived after presenting a high serum cTnI (Nath et al. 2012).

Other markers can be used in the diagnosis of cardiac disease in horses (Rossi et al. 2014). In this study, CK and AST were dosed in three horses that recovered, in which Horse 6 presented a significant enzyme increase. However, these enzymes lack tissue specificity for the diagnosis of heart disease since they are also present in skeletal muscle and liver (Schwarzwald et al. 2003, Nath et al. 2012, Rossi et al. 2014, Ruby et al. 2018). Therefore, the results here presented suggest that the mensuration of cTnI can be sensitive to clinical evaluation and detection of myocardial disease in horses suspected to be intoxicated with ionophores. Differential diagnosis of IA intoxication in horses must include diseases characterized as cardiomyopathy and/or myopathy, such as exertional rhabdomyolysis and intoxication by *Senna occidentalis* (Irigoyen et al. 1991). The epidemiological findings and the IA identification in the commercial feed were essential to make the diagnosis.

CONCLUSION

Serum determination of cTnI and IHC utilizing anti-cTnC antibody can be considered good markers to determine cardiac lesion in horses intoxicated with salinomycin with clinical evolution of 48 hours or more. IHC is an important diagnostic tool and assisted in lesion identification in the reported cases. Cardiomyocytes, histologically characterized by cellular death, had an absence of cTnC labeling, which demonstrates a sensitivity of this human marker in horses. Regarding the prognostic value of these tests, more research is necessary to correlate serum determination of cTnI with the survival of horses with toxic cardiac lesions.

Acknowledgments.- The authors are grateful to the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq). This study was partially funded by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), Brazil – Finance Code 001.

Conflict of interest statement.- The authors declare having no conflicts of interest.

Authors’ contributions.- C.B. Pohl, B.S. Cecco, L.C. Henker, M.B. Bandinelli, R.M. Bianchi, W. Panziera, S.P. Pavarini and D. Driemeier contributed to the collection of the samples, made a substantial contribution to the gross, histopathological analysis, drafted and revised the manuscript and its final version.

REFERENCES

- Aleman M., Magdesian K.G., Peterson T.S. & Galey F.D. 2007. Salinomycin toxicosis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230(12):1822-1826. <<https://doi.org/10.2460/javma.230.12.1822>>
- Bandinelli M.B., Bassuino D.M., Fredo G., Mari C., Driemeier D., Sonne L. & Pavarini S.P. 2014. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. *Pesq. Vet. Bras.* 34(9):837-844 <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000900006>>
- Bezerra Jr. P.S., Driemeier D., Loretto A.P., Riet-Correa F., Kamphues J. & Barros C.S.L. 1999. Monensin poisoning in Brazilian horses. *Vet. Hum. Toxicol.* 41(6):383-385.
- Bezerra Jr P.S, Ilha M.R.S, Langohr I.M. & Barros C.S.L. 2000. Intoxicação experimental por monensina em equinos. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):102-108.
- Campbell H., Nayeri G. 2006. Determination of monensin, narasin, and salinomycin in mineral premixes, supplements, and animal feeds by liquid chromatography and post-column derivatization: collaborative study. *J. AOAC Int.* 89(5): 1229-1242.
- Cooper B.J. & Valentine B.A. 2016. Muscle and tendon, p. 164-249. In: Jubb, Kennedy, and Palmer’s Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed., Elsevier, Ontario.
- Cornelisse C.J., Schott II H.C., Olivier N.B., Mullaney T.P., Koller A., Wilson D.V. & Derkser F.J. 2020. Concentration of cardiac troponin I in a horse with a ruptured aortic regurgitation jet lesion and ventricular tachycardia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217(2):231-235. <<https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.231>>
- Divers T.J., Kraus M.S., Jesty S.A., Miller A.D., Mohammed H.O., Gelzer A.R., Mitchell L.M., Soderholm V. & Ducharme N.G. 2009. Clinical findings and serum cardiac troponin I concentrations in horses after intragastric administration of sodium monensin. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21(3):338-343. <<https://doi.org/10.1177/104063870902100305>>
- Doonan G.R., Brown C.M., Mullaney T.P., Brooks D.B., Ulmanis E.G. & Slanker M.R. 1989. Monensin poisoning in horses—an international incident. *Can. Vet. J.* 30(2):165, 1989.
- Fishbein M.C., Wang T., Matijasevic M., Hong L. & Apple F.S. 2003. Myocardial tissue troponins T and I: an immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc. Pathol.* 12(2):65-71. <[https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(02\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(02)00188-6)>
- Horwitz W., Latimer J.W. 2005. (Eds.). Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. 2005 Current through revision 1, 2006. AOAC International, Gaithersburg.
- Irigoyen L.F., Graça D.L. & Barros C.S.L. 1991. Intoxicação experimental por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em equinos. *Pesq. Vet. Bras.* 1(1/2):35-44.
- Kaneko J. J., Harvey J. W. & Bruss M. L. 2008. (Ed.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press.
- Karapinar T., Eroksuz Y., Beytut E., Sozdutmaz I., Eroksuz H. & Dabak M. 2012. Increased plasma cardiac troponin I concentration in lambs with myocarditis. *Vet. Clin. Path.* 41(3):375-381. <<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00448.x>>
- Nath L.C., Anderson G.A., Hinchcliff K.W. & Savage C.J. 2012. Serum cardiac troponin I concentrations in horses with cardiac disease. *Aust. Vet. J.* 90(9):351-357. <<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.00970.x>>
- Novilla M.N., McClary D. & Laudert S.B. 2017, Ionophores p. 503-518. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. Academic. Press.
- O’Brien P.J. 2008. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology.* 245(3):206-218. <<https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.006>>
- O’Brien P.J., Smith D.E.C., Knechtel T.J., Marchak M.A., Prumboom-Brees I., Brees D.J., Spratt D.P., Archer F.J., Butler P., Potter A.N., Provost J.P., Richard J., Snyder P.A. & Reagan W.J. 2006. Cardiac troponin I is a

- sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab. Anim.* 40(2):153-171. <<https://doi.org/10.1258/002367706776319042>>
- Pavarini S.P., Bandinelli M.B., Juffo G.D., Souza S.O.D., Driemeier D. & Cruz C.E.F.D. 2012. Decreased expression of cardiac troponin C is associated with cardiac lesions in *Amorimia exotropa* poisoned cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 32(10):1005-1008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001000010>>
- Pavarini S.P., Wouters F., Bandarra P.M., Souza F.S., Dalto A.G., Gomes D.C., Cruz C.E.F.D. & Driemeier D. 2011. Surto de intoxicação por monensina em avestruzes e equinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10):844-850. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001000003>>
- Rishniw M. & Simpson K.W. 2005. Cloning and sequencing of equine cardiac troponin I and confirmation of its usefulness as a target analyte for commercial troponin I analyzers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(6):582-584. <<https://doi.org/10.1177/104063870501700611>>
- Rossi T.M., Pyle W.G., Maxie M.G., Pearl D.L. & Physick-Sheard P.W. 2014. Troponin assays in the assessment of the equine myocardium. *Equine. Vet. J.* 46(3):270-275. <<https://doi.org/10.1111/evj.12209>>
- Ruby R.E., Wong D.M., Ware W.A. & Ackermann M.R. 2018. Myocardial fibrosis and ventricular tachyarrhythmia in a thoroughbred filly. *J. Equine. Vet. Sci.* 70:107-111. <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.08.006>>
- Schwarzwald C.C., Hardy J. & Buccellato M. 2003. High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multiform ventricular tachycardia and myocardial necrosis. *J. Vet. Intern. Med.* 17(3):364-368. <<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02464.x>>
- Tunca R., Sozmen M., Erdogan H., Citil M., Uzlu E, Ozen H. & Gokçe E. 2008. Determination of cardiac troponin I in the blood and heart of calves with foot-and-mouth disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(5):598-605. <<https://doi.org/10.1177/104063870802000510>>
- Wells S.M. & Sleeper M. 2018. Cardiac troponins. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 18(3):235-245. <<https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00307.x>>

Tables

Table 1. Age, breed, and sex of salinomycin intoxicated horses.

HORSE	AGE	BREED	SEX
1‡	11-years-old	Criollo	M
2‡	4-months-old	MB	F
3‡	8-years-old	Mangalarga Marchador	M
4‡	10-years-old	Quarter Horse	M
5#	4-years-old	Quarter Horse	M
6#	5-years-old	Criollo	M
7#	5-months-old	MB	F

‡ necropsied; #recovered; M = male; F = female; MB = mixed breed.

Table 2. Relation among histologic lesions in the heart, labeling anti-cTnC, and serum values of cTnI, CK and AST, with the clinical evolution after the onset of clinical signs in horses intoxicated with salinomycin.

Horse	Histology	IHC ANTI- TROPONIN C	Troponin I (cTnI) RR: <0.04 ng/mL ^A	Creatine kinase (CK) RR: <140 U/L ^B	Aspartate aminotransferase (AST) RR: 361 a 1377 U/L ^B	Clinical course
1‡	+	*	n/a	n/a	n/a	6 hours
2‡	++	**	0.509 ng/mL	n/a	n/a	72 hours
3‡	+	*	0.051 ng/mL	n/a	n/a	48 hours
4‡	++	**	6.573 ng/mL	n/a	n/a	72 hours
5#	n/a	n/a	0.009 ng/mL	359 U/L	361 U/L	72 hours
6#	n/a	n/a	0.156 ng/mL	1153 U/L	1377 U/L	48 hours
7#	n/a	n/a	0.005 ng/mL	503 U/L	662 U/L	48 hours

RR: reference range. ‡necropsy; # recovered; n/a = not evaluated; + mild cardiac lesions; ++ moderate cardiac lesions; *mild areas of labeling depletion; **moderate areas of labeling depletion. ^A: (Rossi et al. 2014). ^B: (Kaneko et al. 2008).

Figure and figure legends:



Fig.1: Salinomycin intoxication in horses. Macroscopic findings. Heart cut surface exhibiting focally extensive pale areas in the myocardium.

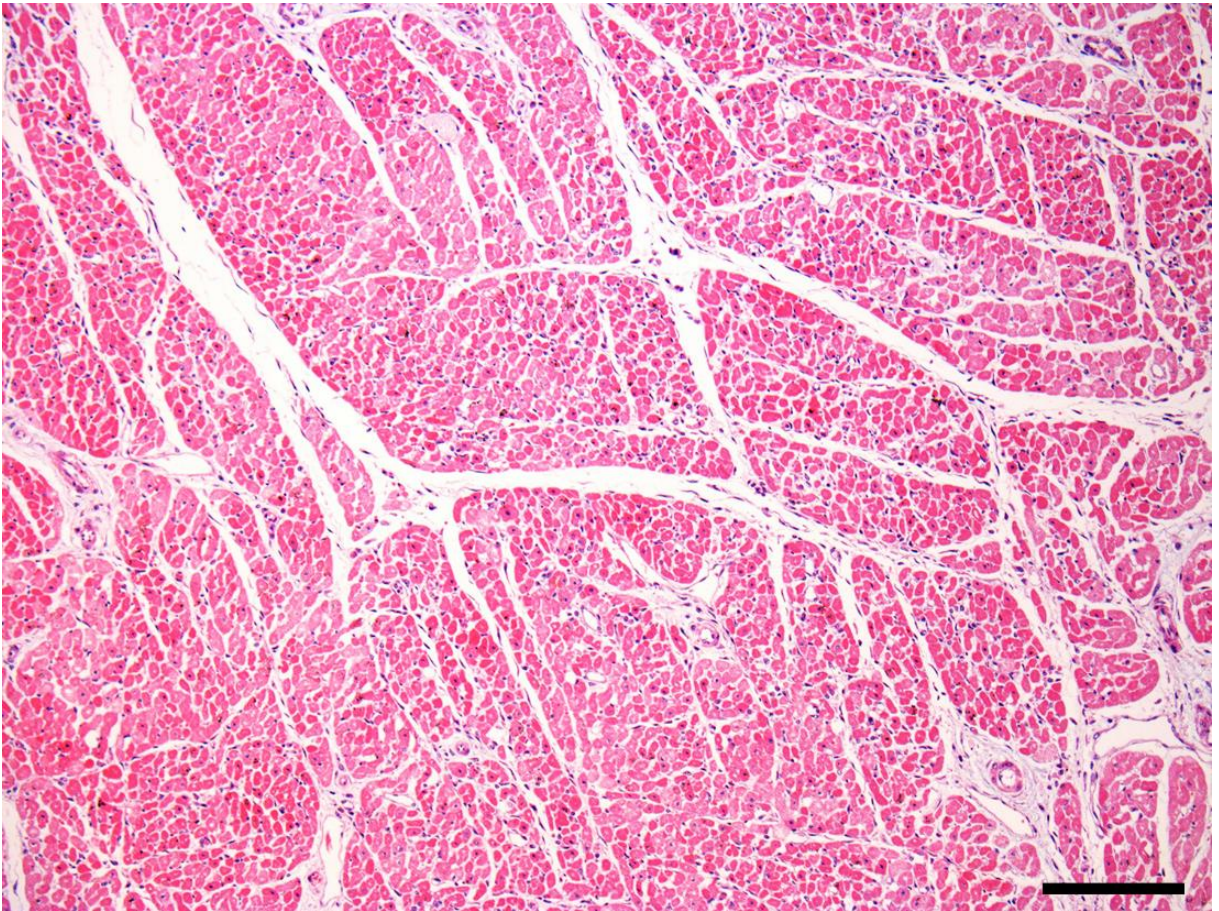


Fig.2: Myocardium from salinomycin-intoxicated horses. Cardiomyocytes displaying enhanced eosinophilia. HE. Bar, 500 μ m.

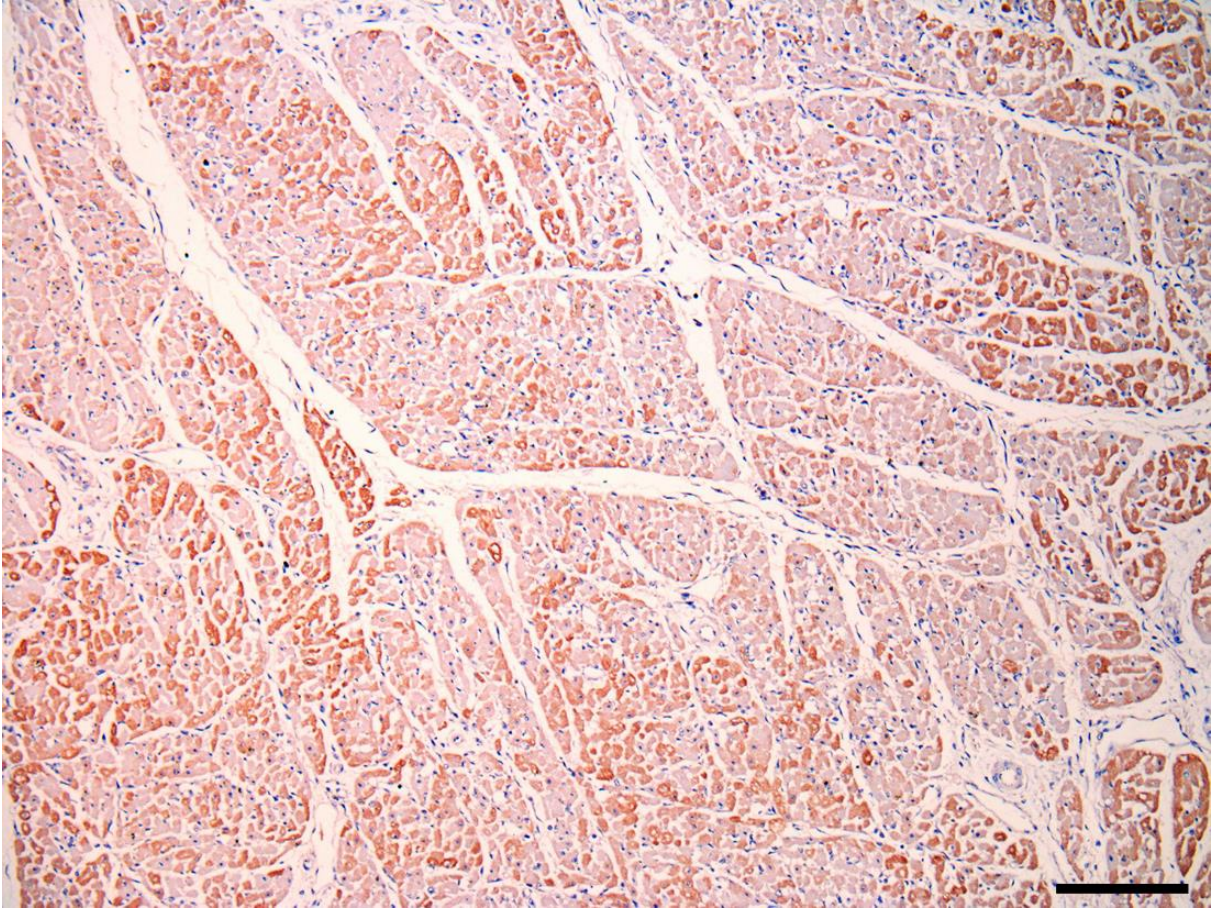


Fig. 3: Multifocal areas of decreased anti-cardiac troponin immunolabeling within the cytoplasm of altered cardiomyocytes who presented hypereosinophilia in figure Bar, 500 μm .

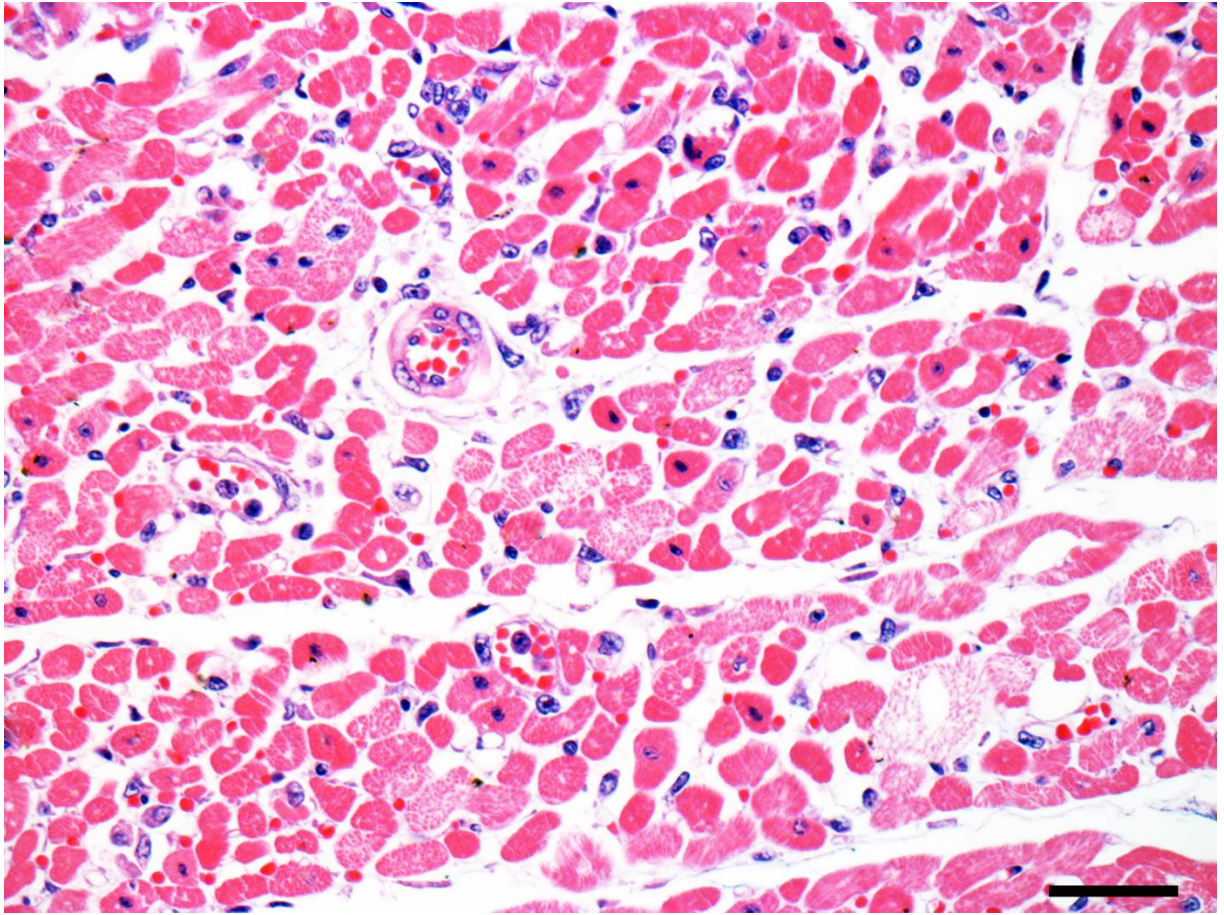


Fig. 4: Closer image demonstrating individual necrosis and necrosis of small groups of cardiomyocytes. Necrotic cells hyper-eosinophilic and homogenous cytoplasm, and occasional nuclear pyknosis. HE. Bar, 50 μ m.

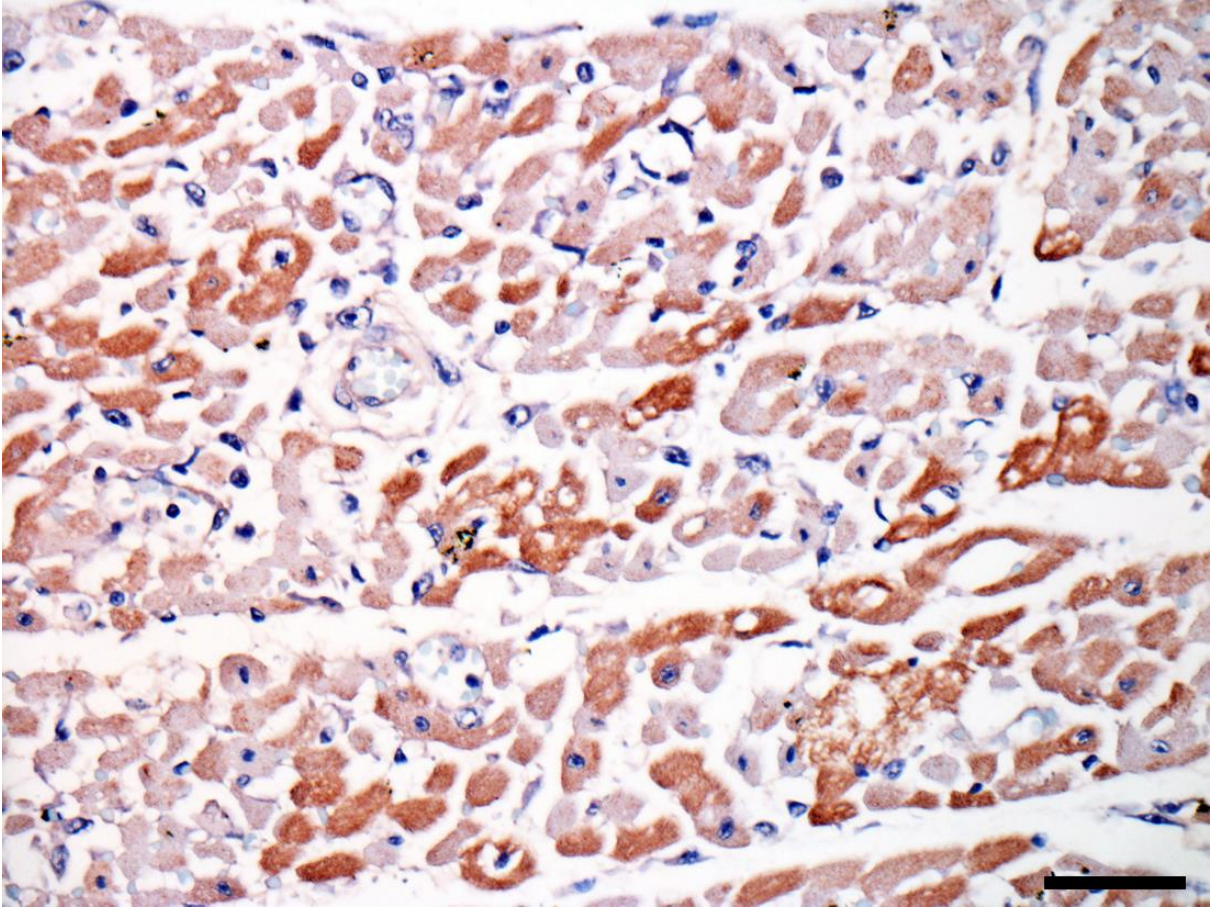


Fig. 5: Multifocally, severe absence or decrease in anti-cTnC labeling corresponding to the hypereosinophilic fibers of figure 5. Bar, 50 μ m.

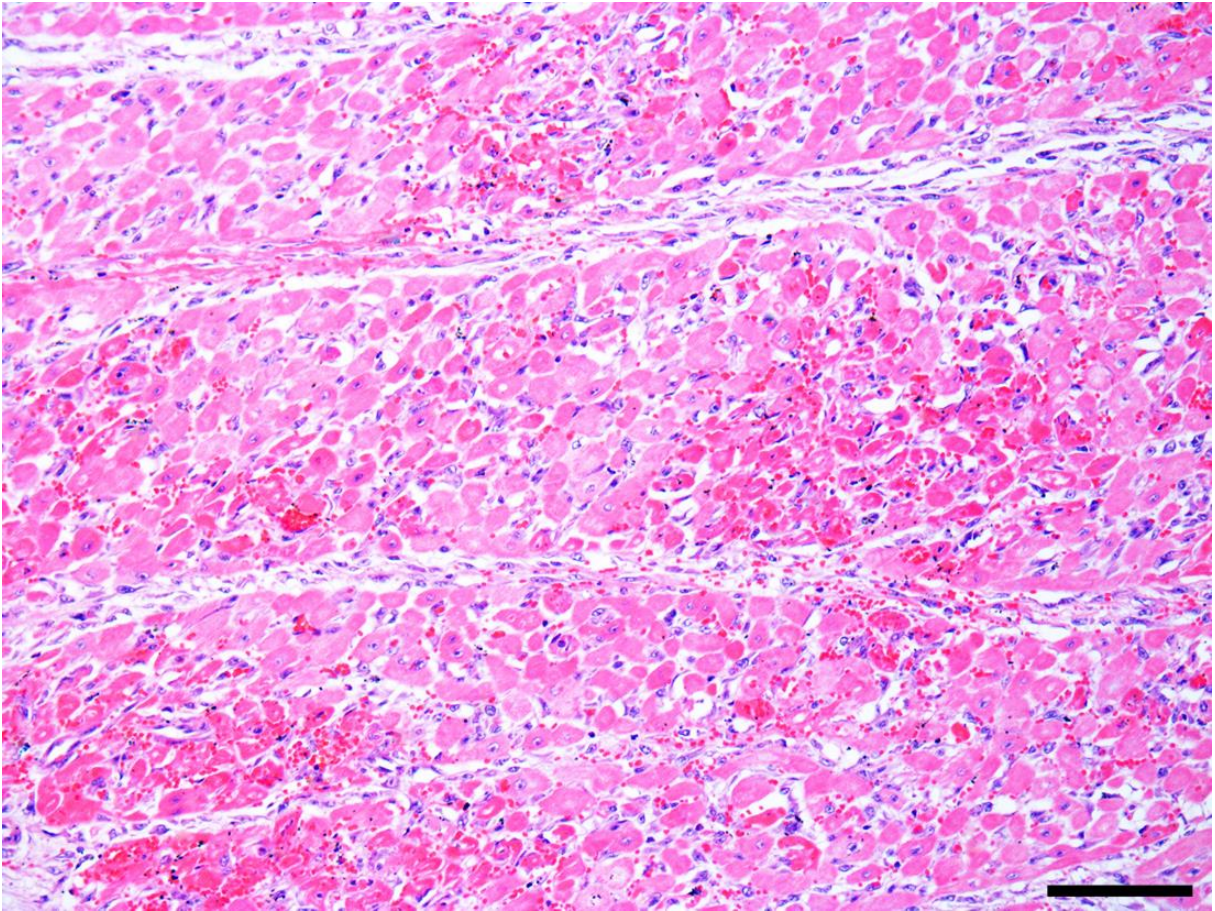


Fig. 6: Histological lesion in cardiac muscle of an equine with prolonged clinical evolution exhibiting accentuated areas of necrosis of cardiomyocytes. HE. Bar, 100 μ m.

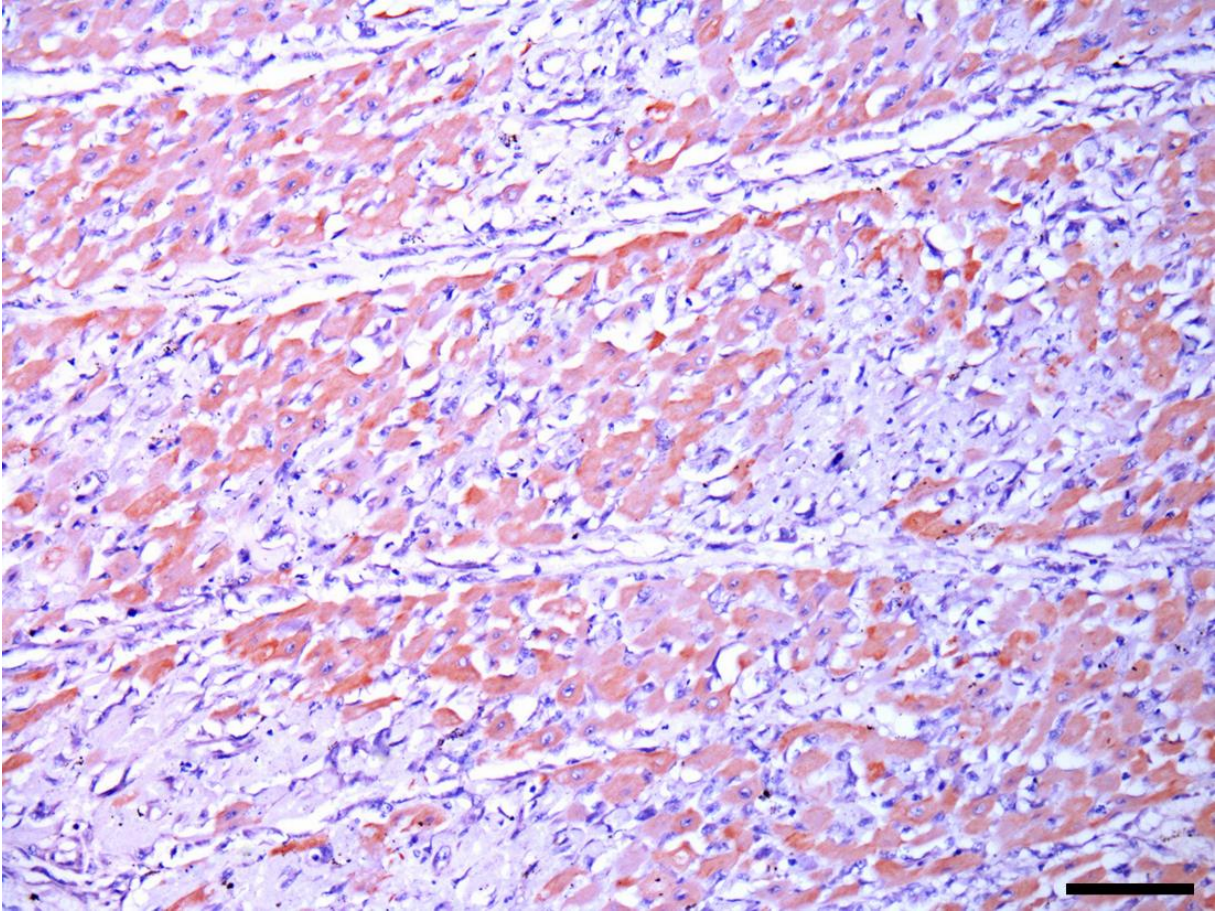


Fig. 7: Marked absence of labeling anti-cTnC in areas corresponding to the necrotic foci from the previous figure. Bar, 100 μ m.

3. CONCLUSÃO

A determinação sérica de cTnI e IHQ podem ser bons marcadores para determinar as lesões cardíacas em equinos intoxicados por salinomicina com evolução clínica de 48 horas ou mais. A IHQ é uma importante ferramenta diagnóstica e auxiliou na identificação das lesões cardíacas nos casos aqui relatados. Os cardiomiócitos caracterizados histologicamente por morte celular, apresentaram ausência de marcação com cTnI, o que demonstra a sensibilidade desse marcador humano em equinos. Porém o valor prognóstico não pode ser estimado, portanto mais trabalhos devem ser realizados neste contexto.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAN, M. et al. Salinomycin toxicosis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 12, p. 1822-1826, 2007.

ALPERT, J. S. et al. Myocardial infarction redefined-A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 3, p. 959-969, 2000.

ALPHARMA. Safety and toxicity of polyether ionophores in livestock and poultry. Technical Bulletin, 2002. Disponível em: <http://www.alpharma.com/newahd/pages/getfile.aspx?m=view&id=%5C%5CPdf%5CTechbullpdf%>

ARMIÉN, A. G. et al. Surto de intoxicação por narasina em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 63-68, 1997.

BANDINELLI, M. B. et al. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 837-844, 2014.

BARROS, C. S. L. Intoxicação por antibióticos ionóforos. **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**, v. 2, p. 45-49, 2007.

BASSUINO, D. M. et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 455-460, 2016.

BECK, B. E.; HARRIES, W. N. The diagnosis of monensin toxicosis: A report on outbreaks in horses, cattle and chickens. In: **Proceedings of... annual meeting-American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (USA)**. 1979.

BEZERRA, P. S. et al. Monensin poisoning in Brazilian horses. **Veterinary and human toxicology**, v. 41, n. 6, p. 383, 1999.

BEZERRA, P. S. et al. Intoxicação experimental por monensina em eqüinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 102-108, 2000.

BODOR, G. S. et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. **Clinical chemistry**, v. 38, n. 11, p. 2203-2214, 1992.

BOURQUE, J. G.; SMART, M.; WOBESER, G. Monensis toxicity in lambs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 10, p. 397, 1986.

BRASIL. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. 2007. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/br/estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo-a-relatorio-completo.aspx>.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>

BUCZINSKI, S., BÉLANGER, A. Bovine tricuspid endocarditis as a cause of increased serum concentration of cardiac troponins. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 195, 2010.

CONSTABLE, P. D. et al. **Veterinary medicine-e-book: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Elsevier Health Sciences, v. 11, p. 701-703, 2016.

COOPER, B. J.; VALENTINE, B. A. Chapter 3: Muscle and Tendon. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, v. 6, p. 164-249, 2016.

CORNELISSE, C. J. et al. Concentration of cardiac troponin I in a horse with a ruptured aortic regurgitation jet lesion and ventricular tachycardia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 2, p. 231-235, 2000.

DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ, N. I. et al. Case report: outbreak of sodium monensin intoxication in feedlot cattle from Mexico. **Revue Med. Vet**, v. 163, p. 60-63, 2012.

DECLOEDT, A. et al. Acute and long-term cardiomyopathy and delayed neurotoxicity after accidental lasalocid poisoning in horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 4, p. 1005-1011, 2012.

DEFRANCESCO, T. C. et al. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 16, n. 5, p. 553-557, 2002.

DIVERS, T. J. et al. Clinical findings and serum cardiac troponin I concentrations in horses after intragastric administration of sodium monensin. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 21, n. 3, p. 338-343, 2009.

DOONAN, G. R. et al. Monensin poisoning in horses—an international incident. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 2, p. 165, 1989.

EBASHI, S.; ENDO, M. Calcium and muscle contraction. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 18, p. 123-183, 1968.

ECHENIQUE, J. V. Z. et al. Leukoencephalomalacia in horses associated with immature corn consumption. **Ciência Rural**, v. 49, n. 3, 2019.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. 2014. Disponível em: www.fao.org/faostat/en/#data/QA

FIGUEIREDO, L. T. M. Arboviroses emergentes no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FILATOV, V. L. et al. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. **Biochemistry c/c of Biokhimiia**, v. 64, p. 969-985, 1999.

FISHBEIN, M. C. et al. Myocardial tissue troponins T and I: an immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. **Cardiovascular Pathology**, v. 12, n. 2, p. 65-71, 2003.

FRANÇA, T. N. et al. Intoxicação acidental por monensina em ovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 743-746, 2009.

GAVA, A. et al. Intoxicação por salinomicina em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 3-4, p. 127-130, 1997.

GODOY, K. C. S. et al. Changes in myocardial injury indicators in naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 313-320, 2016.

GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary toxicology: basic and clinical principles**. Academic press, v.2, p. 1281-1299, 2012.

HANSON, L. J.; EISENBEIS, H. G.; GIVENS, S. V. Toxic effects of lasalocid in horses. **American journal of veterinary research**, v. 42, n. 3, p. 456-461, 1981.

HICKMAN, Peter E. et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. **Clinica chimica acta**, v. 411, n. 5-6, p. 318-323, 2010.

HOSSEINI, R. et al. ECG alterations and changes in biochemical parameters associated with experimental salinomycin toxicosis in sheep. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 14, n. 2, p. 120-125, 2013.

IRIGOYEN, L. F.; GRAÇA, D. L.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em eqüinos. **Pesqui. vet. bras**, p. 35-44, 1991.

KARAPINAR, T. et al. Increased plasma cardiac troponin I concentration in lambs with myocarditis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 3, p. 375-381, 2012.

KARSAI, F. et al. Gehäuft auftretende Narazin-Vergiftung bei Hunden. **Tierärztl. Umschau**, v. 45, p. 316-324, 1990.

LARUE, C. et al. Cardiac-specific immunoenzymometric assay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction. **Clinical chemistry**, v. 39, n. 6, p. 972-979, 1993.

LORENZETT, M. P. et al. Neurotoxicosis in horses associated with consumption of *Trema micrantha*. **Equine veterinary journal**, v. 50, n. 2, p. 192-195, 2018.

- LUCENA, R. B. et al. Surtos de intoxicação por salinomicina em chinchilas (*Chinchilla lanigera*). **Pesq. Vet. Bras**, v. 32, n. 1, p. 43-48, 2012.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 205-210, 2014.
- MARGOSSIAN, S. S.; COHEN, C. Troponin subunit interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 81, n. 3, p. 409-413, 1973.
- MISKIMINS, D. W.; NEIGER, R. D. Monensin toxicosis in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 3, p. 396-397, 1996.
- MORGAN, J. P.; STAVENBORN, M. Disseminated idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) in a dog. **Veterinary radiology**, v. 32, n. 2, p. 65-70, 1991.
- NATH, L. C. et al. Serum cardiac troponin I concentrations in horses with cardiac disease. **Australian veterinary journal**, v. 90, n. 9, p. 351-357, 2012.
- NICODEMO, M. L. F. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. **Embrapa Gado de Corte- Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.
- NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 29, n. 3, p. 191-197, 2009.
- NOVILLA, M. N.; MCCLARY, D.; LAUDERT, S. B. Chapter 29-Ionophores. *Reproductive and Developmental Toxicology*. 2: 503-518. 2017.
- NOVILLA, M. N. The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores. **Veterinary and human toxicology**, v. 34, n. 1, p. 66-70, 1992.
- NOVILLA, M. N.; OWEN, N. V.; TODD, G. C. The comparative toxicology of narasin in laboratory animals. **Veterinary and human toxicology**, v. 36, n. 4, p. 318-323, 1994.
- O'BRIEN, P. J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 206-218, 2008.
- OMIDI, A. et al. Accidental salinomycin intoxication in calves. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 10, p. 1143, 2010.
- OYAMA, M. A.; SISSON, D. D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 831-839, 2004.
- PAVARINI, S. P. et al. Surto de intoxicação por monensina em avestruzes e equinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 844-850, 2011.
- PAVARINI, S. P. et al. Decreased expression of cardiac troponin C is associated with cardiac lesions in *Amorimia exotropa* poisoned cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1005-1008, 2012.

- PAVARINI, S. P. et al. Novos aspectos sobre a intoxicação por *Trema micrantha* (Cannabaceae) em equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1339-1344, 2013.
- PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 eqüinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 275-280, 2009.
- PRESSMAN, B. C. Induced active transport of ions in mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 53, n. 5, p. 1076, 1965.
- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual review of biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 501-530, 1976.
- PRESSMAN, B. C. Ionophorous antibiotics as models for biological transport. In: **Federation proceedings**, p. 1283-1288, 1968.
- RAJAIAN, H. et al. Effects of various oral doses of salinomycin on serum biochemical parameters in calves. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 3, p. 233-237, 2009.
- REICHMANN, P.; LISBOA, J. A. N.; ARAUJO, R. G. Tetanus in equids: a review of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 9, p. 518-523, 2008.
- RICCHIUTI, V. et al. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. **American journal of clinical pathology**, v. 110, n. 2, p. 241-247, 1998.
- RIET-CORREA, F.; SOARES, M. P.; MÉNDEZ, M. del C. Intoxicações em eqüinos no Brasil. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 715-722, 1998.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. del C. Intoxicações por plantas e micotoxinas. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**, v. 2, p. 99-283, 2007.
- RISSI, D. R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação espontânea por antibióticos ionóforos em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 219-221, 2010.
- RODER, J. D. Ionophore toxicity and tolerance. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 2, p. 305-314, 2011.
- ROLLINSON, J.; TAYLOR, F. G.; CHESNEY, J. Salinomycin poisoning in horses. **The Veterinary Record**, v. 121, n. 6, p. 126-128, 1987.
- ROSSI, T. M. et al. Troponin assays in the assessment of the equine myocardium. **Equine veterinary journal**, v. 46, n. 3, p. 270-275, 2014.
- ROZZA, D. B. et al. Monensin toxicosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 18, n. 5, p. 494-496, 2006.
- ROZZA, Daniela B. et al. Experimental monensin poisoning in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 172-178, 2007.

RUBY, R. E. et al. Myocardial Fibrosis and Ventricular Tachyarrhythmia in a Thoroughbred Filly. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 70, p. 107-111, 2018.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1, 1989.

SALLES, M. S.; LOMBARDO, C. S. B.; BARROS, S. S. Ionophore antibiotic (narasin) poisoning in rabbits. **Veterinary and human toxicology**, v. 36, n. 5, p. 437-444, 1994.

SCHWARZWALD, C. C.; HARDY, J.; BUCCELLATO, M. High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multiform ventricular tachycardia and myocardial necrosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 364-368, 2003.

SCHWEITZER, D. et al. Accidental monensin sodium intoxication of feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 10, p. 1273-1276, 1984.

SOUSA, D. E. R. et al. Surto de intoxicação por monensina sódica em equinos associada a consumo de suplemento mineral à base de melação de cana-de-açúcar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, p. 363, 2019.

TUNCA, R. et al. Determination of cardiac troponin I in the blood and heart of calves with foot-and-mouth disease. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 20, n. 5, p. 598-605, 2008.

VARGA, A. et al. Correlation of serum cardiac troponin I and myocardial damage in cattle with monensin toxicosis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 5, p. 1108-1116, 2009.

WEIBLEN, R. Infecções por herpesvírus equinos. **Doenças de Ruminantes e Equinos**, v. 1, p. 138-146, 2007.

WELLS, S. M.; SLEEPER, M. Cardiac troponins. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 3, p. 235-245, 2008.

WOUTERS, A. T. B.; WOUTERS, F.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por narasina em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 82-88, 1997a.

WOUTERS, A. T. B.; WOUTERS, F.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por narasina em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 3/4, p. 89-95, 1997b.

ZUCCA, E. et al. Echocardiographic measurements of cardiac dimensions in normal Standardbred racehorses. **Journal of veterinary cardiology**, v. 10, n. 1, p. 45-51, 2008.