

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

**ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL DAS LESÕES HEPÁTICAS E  
ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO POR *Myoporum  
laetum* EM OVINOS E BOVINOS**

**JOSIANE BONEL RAPOSO**

**PORTO ALEGRE - RS**

**2004**

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

**ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL DAS LESÕES HEPÁTICAS E  
ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO POR *Myoporum*  
*laetum* EM OVINOS E BOVINOS**

**JOSIANE BONEL-RAPOSO<sup>1</sup>**

Tese apresentada como  
requisito para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de  
Patologia.

Orientador: **Prof. Dr. David Driemeier.**

<sup>1</sup>Mestre em Ciências

**PORTO ALEGRE**

**2004**

**COMITÊ DE APROVAÇÃO****JOSIANE BONEL RAPOSO**

ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL DAS LESÕES HEPÁTICAS E ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS CAUSADAS PELA INTOXICAÇÃO POR *Myoporum laetum* EM OVINOS E BOVINOS

Aprovada em 16 de abril de 2004.

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Aldo Gava

Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Glauca Denise Kommers

Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Schild

Membro da Comissão

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tese aos meus pais Clóvis e Lira, que mesmo não estando presentes mais nesse mundo, de onde estiverem sempre me acompanharam, “EU AMO VOCÊS”.

Especial dedicação ao grande presente que Deus me enviou, o meu filho Flavinho, que me traz muita alegria e felicidade. Assim como o meu esposo Cadú que além de companheiro nos permite viver essa felicidade chamada família.

Dedico, também, esse tese a minha mana Izani que muito colaborou e cuidou da coisa mais preciosa no mundo que é o meu filho nos momentos em que me ausentei.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela força concedida, coragem e sabedoria em todos os momentos da minha vida, em especial para a realização deste trabalho.

Ao Carlos Eduardo Ferreira Raposo, meu esposo, pelo apoio, paciência e amor demonstrado durante todo o período de realização deste trabalho.

Ao Flávio Bonel Raposo, meu filho, o grande amor da minha vida, pela compreensão nos momentos que tive que me ausentar.

Ao professor Dr. David Driemeier, pela acolhida, amizade e orientação e, principalmente pela paciência demonstrada durante a realização deste trabalho.

Ao professor Severo Sales de Barros, pelo seu paternalismo, carinho, amizade, contribuições e sugestões na redação deste trabalho e na minha vida.

À minha grande amiga Silvia Leal Ladeira pela força, amizade e carinho, e, principalmente pelos momentos de estudo para o nosso crescimento profissional.

Aos colegas Cristina Gevehr-Fernandes e Paulo Velardez Mielke pelo carinho, incentivo, amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À amiga Zuleica de Freitas Rayné, pela amizade, apoio e carinho nos momentos difíceis para realização deste trabalho.

Aos amigos funcionários João Francisco Nunes (Histopatologia) e Simone Silveira da Silva (Microscopia Eletrônica) do Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, pela realização de suas apuradas técnicas em histoquímica e microscopia eletrônica que são a base deste trabalho.

A colega Ana Lúcia Schild, pelo apoio e amizade demonstrados.

À amiga Carmem Bailardi e Adriana Stigger pela força, amizade e carinho durante a realização experimental deste trabalho.

Ao Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

A todos, que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

### **Estudo histológico e ultra-estrutural das lesões hepáticas e alterações hepáticas causadas pela intoxicação por *Myoporum laetum* em ovinos e bovinos**

Autora: Josiane Bonel Raposo

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Amostras de *Myoporum laetum* foram colhidas durante a primavera e verão e administradas a sete ovinos e seis bovinos em doses únicas de 20 e 30g/kg. Amostras de sangue e biopsias hepáticas foram obtidas destes animais e de 4 ovinos e 3 bovinos controles, antes e 1, 3 e 7 dias após a administração da planta. As biopsias foram analisadas histológica e ultra-estruturalmente. A partir das amostras de sangue analisaram-se os níveis séricos de GGT, AST e bilirrubina total. Os sinais clínicos, em ovinos, caracterizaram-se, especialmente, por depressão, diminuição dos movimentos ruminais, fezes ressequidas, tenesmo, ranger de dentes, dispnéia e lesões de fotossensibilização. Em bovinos, o quadro clínico foi discreto. Em ovinos os níveis enzimáticos de AST, GGT e bilirrubina total elevaram-se 24 horas após a administração da planta, mas não nos controles. Os principais achados histológicos, em ovinos, incluíram vacuolização de hepatócitos, fibrose portal, proliferação de ductos biliares e necrose de hepatócitos periportais. Os estudos ultra-estruturais, em ovinos, revelaram hiperplasia do retículo endoplasmático liso, tumefação de hepatócitos, degranulação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, presença de cristais aciculares, retenção biliar, tumefação de mitocôndrias e várias outras alterações degenerativas. Em bovinos, os sinais clínicos, achados histológicos e ultra-estruturais e alterações bioquímicas foram menos evidentes. A evolução da doença foi compatível com as alterações clínicas, histopatológicas, ultra-estruturais e com a atividade enzimática.

## ABSTRACT

### **Histological and ultrastructural study of hepatic lesions and hepatic alterations in experimental *Myoporum laetum* poisoning of sheep and cattle**

Author: Josiane Bonel Raposo

Advisor: Prof. Dr. David Driemeier

Green leaves of *Myoporum laetum* were collected during spring and summer, and administered to seven sheep and six steers at dosages of 20 and 30 g/kg. Blood samples and hepatic biopsies were taken before and 1, 3 and 7 days after dosage. In sheep, the clinical signs were depression, rumen hypomotility, dried feces, tenesmus, teeth grinding, dyspnea and lesions of photosensitization. In cattle, the clinical picture was much less pronounced. In sheep the serum levels of AST, GGT and total bilirubin increased even before 24 hours after dosing the plant, except for the controls. The main histological findings in sheep were vacuolization of hepatocytes, portal fibrosis, bile duct proliferation and necrosis of periportal hepatocytes; the ultrastructural examination revealed hyperplasia of the smooth endoplasmic reticulum, hepatocellular hydropic degeneration, presence of crystals and several other degenerative changes. In cattle, the serum enzymatic activity, the histological and the ultrastructural findings, biochemistry changes were less evident. Concerning disease evolution, there was positive correlation between clinical, histological, ultrastructural changes and enzymatic activity



## SUMÁRIO

<b>COMITÊ DE APROVAÇÃO</b> .....	3
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	4
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	5
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2 CAPÍTULO 1: Evolução das lesões histológicas e ultra-estruturais no fígado de ovinos e bovinos experimentalmente intoxicados por <i>Myoporium laetum</i></b> .....	16
ABSTRACT .....	17
RESUMO .....	17
INTRODUÇÃO .....	18
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
RESULTADOS .....	20
DISCUSSÃO .....	27
REFERÊNCIAS .....	29
<b>3 CAPÍTULO 2: Observações clínicas e bioquímicas em ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por <i>Myoporium laetum</i></b> .....	32
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	34
INTRODUÇÃO .....	34
MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
RESULTADOS .....	38
DISCUSSÃO .....	47
CONCLUSÕES .....	51
NOTAS INFORMATIVAS .....	51
REFERÊNCIAS .....	52
<b>4 CAPÍTULO 3: Discussão Geral</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59
<b>ANEXOS</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Myoporum laetum* é um arbusto nativo da Nova Zelândia e amplamente distribuído na Austrália e em outros países, sendo utilizado comumente como planta ornamental (ODRIOZOLA et al. 1987).

A intoxicação ocorre quando os animais ingerem folhas de galhos ou árvores derrubadas pelo vento ou podadas. A ingestão pode ocorrer em diferentes situações através do consumo direto de folhas das árvores que estão ao alcance dos animais, ou quando há pouca disponibilidade de forragem, no inverno. Pode ocorrer, ainda, quando os animais procuram abrigo durante tempestades que duram alguns dias; ou em animais transportados (CONNOR 1977, HURST 1942, JERRETT & CHINNOCK 1983, MÉNDEZ 1993, ODRIOZOLA et al. 1987).

A intoxicação por espécies de *Myoporum* ocorre em diversos países como Austrália, Nova Zelândia (ALLEN et al. 1978, JERRETT & CHINNOCK 1983), Japão, China, Ilhas Maurício (SEAWRIGHT et al. 1978) e Argentina (ODRIOZOLA et al. 1987), afetando bovinos, ovinos, eqüinos e suínos. No Uruguai existem históricos clínicos da doença e na região Sul do Rio Grande do Sul são mencionados surtos de fotossensibilização em ovinos, associados ao consumo de *Myoporum* sp. (MÉNDEZ 1993).

O princípio tóxico dessas plantas é encontrado principalmente nas folhas e frutos, e são óleos essenciais furanosesquiterpenos (FST), dos quais o mais conhecido é o ngaione (SEAWRIGHT et al. 1978). As diversas espécies e variedades de *Myoporum*, possuem concentrações diferenciadas de compostos tóxicos e não tóxicos, e por vezes podem ser ingeridas pelos animais sem provocar doença. Pode ocorrer variação na toxicidade de plantas de uma mesma região (ALLEN & SEAWRIGHT 1973).

Os sinais clínicos são observados dois a seis dias após o acesso à planta e caracterizam-se por anorexia, depressão, fezes ressequidas com sangue, atonia ruminal e icterícia. A morte ocorre geralmente entre 24 a 48 horas após a observação dos primeiros sinais clínicos. Quando os animais não morrem nesse período, podem apresentar lesões de fotossensibilização (CONNOR 1977, JERRETT & CHINNOCK 1983, McCANN 1946, ODRIOZOLA et al. 1987, RAPOSO et al. 1998a,b).

As alterações bioquímicas encontradas em bovinos, caracterizam-se por marcado aumento dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT), tanto nas intoxicações espontâneas ou experimentais, com a planta ou com os óleos furanosesquitermos (ALLEN et al. 1978, FORD & RIVERA 1978, JERRETT & CHINNOCK 1983). Aumentos de bilirrubina e filioeritina foram observados, também, em condições experimentais (ALLEN et al. 1978, FORD & RIVERA 1978). RAPOSO et al. (1998a,b) observaram aumento dos níveis séricos de AST, GGT e bilirrubina total em ovinos e bovinos dosados com folhas frescas de *M. laetum*.

Em ovinos intoxicados experimentalmente com folhas de *M. tetrandrum*, houve aumento nos níveis de bilirrubina plasmática e AST (ALLEN et al. 1978), assim como em cordeiros e ovelhas que receberam óleos essenciais de *M. deserti* (ALLEN & SEAWRIGHT 1973).

A elevação sérica da GGT quando apresenta-se elevada indica danos nos ductos biliares e a elevação dos níveis da AST significa alterações nos hepatócitos, embora o aumento possa ser, também, devido a danos em células musculares (JERRETT & CHINNOCK 1983).

As principais lesões causadas por *Myoporum* sp. nos bovinos localizam-se no fígado e caracterizam-se por necrose hemorrágica que pode ser periportal (JERRETT & CHINNOCK 1983); difusa ou mediozonal (ODRIOZOLA et al. 1987), com proliferação de ductos biliares (JERRETT & CHINNOCK 1983, ODRIOZOLA et al. 1987). No entanto, em intoxicações experimentais observa-se predominantemente necrose hemorrágica centrolobular (ALLEN et al. 1978, RAPOSO et al. 1998a,b).

Biopsias hepáticas de bovinos que sobreviveram à intoxicação experimental com folhas de *M. tetrandrum*, óleos essenciais de *M. deserti* (ALLEN et al. 1978), ou folhas frescas de *M. laetum* (RAPOSO et al. 1998a,b) demonstraram necrose centrolobular, com vacuolização dos hepatócitos das áreas mediozonais e periportais.

As lesões hepáticas nos ovinos são principalmente necrose periportal, embora lesões mediozonais e centrolobulares possam ocorrer (ALLEN & SEAWRIGHT 1973, RAPOSO et al. 1998a,b). Recentemente, observou-se no fígado de ovinos intoxicados experimentalmente com folhas de *M. laetum* presença de precipitados de cálcio nas áreas periportais associados a células degeneradas ou necróticas e proliferação do retículo endoplasmático liso (RAPOSO et al. 2000).

A microscopia eletrônica de transmissão do fígado de camundongos intoxicados, demonstrou dilatação do retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, perda de glicogênio

e desaparecimento das células de Kupffer na região mediozonal, uma hora após os animais serem dosados com óleo de algodão. Necrose dos hepatócitos com ruptura da membrana plasmática dando lugar a grandes espaços contendo massas de eritrócitos, fibrina, organelas livres e outros restos celulares foram observados 3 horas após. Em 6 horas havia aumento da formação de estruturas redondas ou ovais delimitadas por membrana no citoplasma dos hepatócitos e nos espaços distendidos causados pela perda de células de Kupffer. Alguns hepatócitos continham corpúsculos que consistiam em retículo endoplasmático rugoso neoformado produzido por células previamente lesionadas, assim como o aumento do número de lisossomos e fagossomos. Uma área confluyente de necrose coagulativa mediozonal estava presente nas primeiras 12 horas. Em 24 horas havia aumento do número de células fagocitárias na zona necrótica seguida por atividade fagocitária dos macrófagos, que conduziam a uma reparação quase completa das áreas mediozonais danificadas dentro de 8-9 dias (SEAWRIGHT & O'DONAHOO 1973).

A ocorrência de intoxicação por *Myoporium* spp. ou outras substâncias hepatotóxicas depende de sua metabolização a metabólitos intermediários no fígado. Um grande número de toxinas são hepatotóxicas porque, na transformação destas substâncias em metabólitos excretáveis o fígado os converte a radicais intermediários reativos tóxicos. A biotransformação destes tóxicos é feita através das oxidases de função mista microssomal (MMFO) hepáticas, que ocorrem em maior concentração na zona centrolobular, em concentração intermediária na região mediozonal e em menor concentração na região periportal (KELLY, 1993). Essas enzimas participam da metabolização de diferentes drogas e parecem ter importância no transporte dos ácidos biliares (HONSCHA et al., 1997). Estudos sugerem que compostos tóxicos sejam metabolizados por duas rotas: uma conjugativa, catalisada por glutation-S-transferases e outra rota oxidativa catalisada pelas citocromo P-450 (PLOEMEN et al. 1997).

A concentração dessas enzimas pode variar em função de alguns fatores. Algumas plantas (*Melaleuca linariifolia*) ou drogas (DDT e barbitúricos) acentuam e outras (SKF 525A) deprimem a atividade das MMFO hepáticas (ALLEN et al. 1992, KELLY 1993, SEAWRIGHT et al. 1978). A fome prolongada pode resultar no catabolismo das enzimas e conseqüente redução da atividade enzimática, conferindo alguma resistência à hepatotoxicidade. Por outro lado o jejum em animais previamente bem alimentados acentua a atividade enzimática (KELLY 1993, SEAWRIGHT et al. 1978).

O estado fisiológico e a idade dos animais também influenciam na quantidade e atividade de algumas enzimas microssomais. A maioria das enzimas microssomais como as

NADH e NADPH-redutases dependentes, assim como as associadas aos citocromos P-450 (hidroxilases anilínicas e coumarínicas, aminopropina N-dimetilase, 7-ethoxicoumarina O-dietilase a glutátion-S-transferase) aumentam sua concentração até os onze meses de idade (KAWALEC & EL-SAID 1990).

Em algumas situações, e especialmente na intoxicação com o *Myoporum laetum*, pequenas doses do tóxico antes da dose letal podem prevenir a intoxicação. Essa proteção ocorre devido à ligação desta pequena dose às MMFO, que se tornariam indisponíveis para metabolizar a dose letal. A complexidade dessas interações pode ser exemplificada pela manipulação experimental do padrão de necrose produzido por ngaione. A administração de uma certa dose dessa toxina a animais normais produz necrose mediozonal em uma alta proporção dos casos. Se antes da intoxicação os animais tiverem suas MMFO hepáticas induzidas pela administração de barbitúricos ou DDT, a distribuição predominantemente é uma necrose periportal. Por outro lado, se a atividade das enzimas for suprimida quimicamente, por exemplo com SKF 525A, a lesão é predominantemente centrolobular. A explicação para este fenômeno está no fato de que a atividade das MMFO é sempre maior na zona centrolobular, mesmo após indução ou supressão, e assume que ngaione e compostos relacionados são degradados por processos cuja eficiência é proporcional à concentração de MMFO na célula. Portanto, se a concentração das enzimas é alta (como nos hepatócitos centrolobulares no animal normal), o tóxico é completamente degradado a metabólitos não tóxicos tão rapidamente que não haverá acúmulo de intermediários tóxicos para danificar a célula. No animal normal a necrose irá ocorrer somente nos hepatócitos mediozonais que tem enzimas suficientes para produzir intermediários tóxicos, mas insuficientes para degradá-los completamente. Os hepatócitos periportais não serão danificados porque não têm enzimas suficientes para produzir metabólitos intermediários. O animal no qual a atividade enzimática é estimulada possui enzimas suficientes nas células centrolobulares e mediozonais para a completa desintoxicação; a necrose é periportal. No fígado com atividade enzimática suprimida, somente hepatócitos centrolobulares retêm atividade enzimática suficiente para produzir concentrações letais de metabólitos intermediários; a necrose neste caso é centrolobular (KELLY 1993, SEAWRIGHT et al. 1978).

Tendo em vista a existência de tantas variáveis envolvidas, o resultado da exposição natural a estas hepatotoxinas torna-se de difícil prognóstico. Tanto a intensidade quanto o padrão das lesões hepáticas dependem da soma das diversas variáveis e das reações metabólicas iniciadas por episódios de intoxicação (KELLY 1993). FORD & RIVERA (1978), acreditam que a variação nos resultados das intoxicações, sugere que o tipo e a

localização da lesão hepática podem ser influenciados por vários fatores como a espécie da planta, o componente de óleo essencial, as espécies e sexo dos animais experimentais ou com a atividade das enzimas microssomais hepáticas. Para ALLEN et al. (1978) a localização das lesões depende, provavelmente, do estado nutricional do animal imediatamente antes do consumo da planta tóxica.

A atividade das enzimas microssomais hepáticas, geralmente é mais baixa em bovinos do que em ovinos e muitas outras espécies domésticas. Os bovinos são menos sensíveis ao óleo tóxico essencial de *Myoporum* spp. que os ovinos (ALLEN et al. 1978, RAPOSO et al. 1998a,b). ALLEN & SEAWRIGHT (1973), sugerem que, em ovinos, a desintoxicação completa e inofensiva dos compostos pode ser alcançada na região centrolobular, mas que existe, quase sempre, aumento suficiente do nível de atividade das MMFO nos hepatócitos periportais, permitindo formação e acúmulo de intermediários tóxicos que podem levar à lesão dos hepatócitos dessa área. Tem sido demonstrado, que diferentes rebanhos de ovinos são provavelmente diferentes na atividade média de suas MMFO, e que a atividade das enzimas sob condições de campo varia com a estação e também com a dieta. No entanto, os resultados de vários estudos experimentais com *Myoporum* e plantas contendo óleos FST em camundongos, ratos e ovinos sugerem que o mecanismo patogênico da toxicidade desses compostos, não é explicado somente pelo grau de atividade das MMFO hepáticas no momento da dosagem. Por exemplo, reduzindo a atividade MMFO hepática por meio de depleção protéica ou adrenalectomia, ao invés do uso de drogas, não diminui a toxicidade do óleo ngaione para os animais. Além disso, o estímulo das MMFO hepática, por qualquer meio, não aumenta a toxicidade do FST para o animal, mas pode até reduzi-la. Apesar disso, aparentemente a inibição ou redução das enzimas pode alterar a zona do lóbulo onde ocorre a lesão dos hepatócitos, mas sem determinar a extensão da lesão do parênquima hepático, nem necessariamente, prevenir a possível formação de metabólitos que podem ser liberados pelo fígado para danificar tecidos vitais distantes (SEAWRIGHT et al. 1978).

Diversos autores relatam a proliferação de ductos biliares na intoxicação por *Myoporum* sp. (JERRETT & CHINNOCK 1983, ODRIOZOLA et al. 1987). Entretanto, estas alterações ainda não foram analisadas. Não se conhece, por exemplo, como se reorganiza o sistema de ductos biliares, nem de que elementos celulares deriva o epitélio dos ductos neoformados. Esses aspectos têm sido caracterizados como danos hepáticos originados por outras causas (MILANI et al. 1989).

As plantas hepatotóxicas e dentre elas, o *Myoporum laetum*, tem causado importantes perdas econômicas para a pecuária do Rio Grande do Sul. Estudos anteriores permitiram a

definição das lesões induzidas pelo *Myoporium laetum* a bovinos e ovinos (RAPOSO et al. 1998a,b). Busca-se agora elucidar a patogenia dessas lesões. A importância desses estudos básicos reside na necessidade de uma compreensão mais adequada da complexa metabolização do princípio tóxico de *M. laetum* no fígado.

Os objetivos deste trabalho são os seguintes:

1. Determinar a evolução das alterações histológicas e ultra-estruturais nos fígados de ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por *M. laetum*.
2. Comparar as alterações microscópicas e ultra-estruturais nas diferentes espécies animais estudadas, procurando estabelecer quais organelas são afetadas na intoxicação por *M. laetum*.
3. Determinar as alterações enzimáticas que ocorrem em animais intoxicados através da dosagem sérica das enzimas AST e GGT e bilirrubina total.

## 2 CAPÍTULO 1

Evolução das lesões histológicas e ultra-estruturais no fígado de ovinos e bovinos experimentalmente intoxicados por *Myoporum laetum*

Artigo publicado na Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 149-155, out./dez. 2003



**Evolução das lesões histológicas e ultra-estruturais no fígado de ovinos e bovinos experimentalmente intoxicados por *Myoporum laetum*<sup>1</sup>**

Josiane Bonel-Raposo<sup>2</sup>, David Driemeier<sup>3</sup>, Severo Sales Barros<sup>4</sup> & Cristina Gevehr-Fernandes<sup>5</sup>

**ABSTRACT.-** Bonel-Raposo J., Driemeier D., Barros S.S. & Gevehr-Fernandes C. 2003. [Histological and ultrastructural evolution of liver lesions in experimental *Myoporum laetum* poisoning of sheep and cattle.] Evolução das lesões histológicas e ultra-estruturais no fígado de ovinos e bovinos experimentalmente intoxicados por *Myoporum laetum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23(4): 149-155. Depart<sup>o</sup> de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: [bonel-raposo@brturbo.com](mailto:bonel-raposo@brturbo.com)

Green leaves of *Myoporum laetum* were collected during spring and summer, and administered to five sheep and six steers at dosages of 20 and 30 g/kg. Liver biopsies were taken before (Controls) and 1, 3 and 7 days after dosage. In sheep, the clinical signs were depression, rumen hypomotility, dried feces, tenesmus, teeth grinding, dyspnea and typical lesions of photosensitization. In cattle, the clinical picture was much less pronounced. The main histological findings in sheep were vacuolization of hepatocytes, portal fibrosis, bile duct proliferation and necrosis of periportal hepatocytes; the ultrastructural examination revealed hyperplasia of the smooth endoplasmic reticulum, hepatocellular hydropic degeneration, presence of crystals and several other degenerative changes. In cattle both, the histological and the ultrastructural findings, were less evident.

**INDEX TERMS:** Poisonous plants, plant poisoning, *Myoporum laetum*, sheep, cattle.

**RESUMO.-** Amostras de *Myoporum laetum* foram colhidas durante a primavera e verão e administradas a cinco ovinos e seis bovinos em doses únicas de 20 e 30 g/kg. Biopsias hepáticas foram colhidas antes (controles) e 1, 3 e 7 dias após a dosagem da planta. Estas biopsias foram analisadas histológica e ultra-estruturalmente. Os sinais clínicos, em ovinos, caracterizaram-se, especialmente, por depressão, diminuição dos movimentos ruminais, fezes ressequidas, tenesmo, ranger de dentes, dispnéia e lesões típicas de fotossensibilização. Em bovinos, o quadro clínico foi discreto. Os principais achados histológicos, em ovinos, incluíram vacuolização de hepatócitos, fibrose portal, proliferação de ductos biliares e necrose de hepatócitos periportais. Os estudos ultra-estruturais, em ovinos, revelaram hiperplasia do retículo endoplasmático liso, tumefação de hepatócitos, degranulação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, presença de cristais aciculares, retenção biliar, tumefação de mitocôndrias e várias outras alterações degenerativas. Em bovinos, tanto os achados histológicos, quanto os ultra-estruturais foram menos evidentes.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plantas tóxicas, intoxicação por plantas, *Myoporum laetum*, ovinos, bovinos.

<sup>1</sup> Recebido em 28 de março de 2003

Aceito para publicação em 9 de maio de 2003.

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Área de Patologia. \*Endereço do Autor para correspondência: Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS 96010-900, Brasil. E-mail: [bonel-raposo@brturbo.com](mailto:bonel-raposo@brturbo.com)

<sup>3</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, UFRGS, Cx. Postal 15094, Porto Alegre, RS, 91540-000.

<sup>4</sup> Pesquisador Visitante da UFRGS e Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

<sup>5</sup> Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS.

## INTRODUÇÃO

Intoxicação por *Myoporum* sp. tem sido descrita em diversos países (Allen et al. 1978, Jerret & Chinnock 1983, Seawright et al. 1978, Odriozola et al. 1987), afetando bovinos, ovinos, eqüinos e suínos. No Uruguai, existem históricos clínicos da doença e, na região Sul do Rio Grande do Sul, são mencionados surtos de fotossensibilização em ovinos, associados ao consumo de *Myoporum* sp (Méndez et al. 1993).

Os compostos tóxicos desta planta são óleos essenciais furanosesquiterpenóides (FST), dos quais o mais conhecido é o ngaione. Os FST concentram-se principalmente nas folhas e nos frutos (Seawright et al. 1978). As diversas espécies e variedades de *Myoporum* sp possuem concentrações variadas de substâncias tóxicas e não-tóxicas. Portanto, ocasionalmente, pode haver consumo destas plantas, sem que ocorra doença. Podem ocorrer variações na toxicidade de plantas em uma mesma região (Allen & Seawright 1973).

A ingestão pode ocorrer em diferentes circunstâncias tais como: após a queda de galhos e árvores por ventanias ou depois de podas; por consumo direto de folhas das árvores que estão ao alcance dos animais; quando, no inverno, há pouca disponibilidade de forragem; durante tempestades prolongadas quando animais procuram abrigo; ou ainda pode ocorrer em animais que foram recentemente transportados (Hurst 1942, Odriozola et al. 1987, Jerret & Chinnock 1983, Méndez et al. 1993).

As lesões microscópicas observadas por Raposo et al. (1998a) de todos os ovinos caracterizaram-se por necrose hepática periportal. Lesões similares foram, também descritas por Allen & Seawright (1973). As principais lesões nos bovinos localizam-se no fígado e caracterizam-se por necrose hemorrágica periportal (Jerrett & Chinnock, 1983); necrose difusa ou mediozonal (Odriozola et al., 1987), com proliferação de ductos biliares (Jerrett & Chinnock, 1983; Odriozola et al., 1987). No entanto, em intoxicações experimentais observaram-se preferentemente necrose hemorrágica centrolobular (Allen et al., 1978). As lesões histológicas descritas por Raposo et al. 1998b, em bovinos caracterizaram-se principalmente por necrose hepática centrolobular e, em alguns casos, estendendo-se até a área mediozonal.

As alterações ultra-estruturais observadas em camundongos experimentalmente intoxicados por via gástrica com ngaione de *Myoporum deserti* incluíram dilatação do retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos e perda das células de Kupffer da região mediozonal e

necrose dos hepatócitos, verificadas respectivamente 1, 3 e 6 horas após a dosagem com o óleo. Uma área confluyente de necrose coagulativa mediozonal estava presente 12 horas pós-ingestão, e foi seguida por atividade fagocitária dos macrófagos. No período de 8 a 9 dias houve uma reparação quase completa das áreas mediozonais danificadas. Danos severos das células de Kupffer, durante os estágios iniciais, e uma rápida proliferação do retículo endoplasmático, em alguns hepatócitos danificados, foram características da lesão (Seawright & O'Donahoo 1973).

A severidade e o padrão das lesões hepáticas dependem da interação de vários fatores como dieta, estado nutricional, administração concorrente de drogas, quantidade de planta ingerida e atividade enzimática (Allen et al. 1978, Seawright et al. 1978, Kelly 1993). O jejum pode induzir o catabolismo das proteínas, causando uma diminuição na concentração das enzimas na região centrolobular e, conseqüentemente, desintoxicação incompleta e acúmulo de metabólitos tóxicos, havendo, portanto a possibilidade de lesão nos hepatócitos locais (Kelly 1993). O tipo e a localização da lesão podem ser influenciados por vários fatores como a espécie da planta, o componente de óleo essencial, a atividade das enzimas microssomais hepáticas, a espécie e o sexo dos animais envolvidos (Ford & Rivera 1978).

O objetivo deste trabalho é estudar a evolução das alterações histológicas e ultra-estruturais nos fígados de ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por *Myoporum laetum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cinco ovinos Corriedale e seis bovinos mestiços foram pesados, mantidos em jejum durante 24 horas e, utilizados neste experimento.

As amostras de *Myoporum laetum* foram colhidas na primavera de 2000 (outubro) e verão de 2001 (janeiro), mantidas sob refrigeração por 12 horas e administradas aos animais conforme esquema de dosagens apresentado no Quadro 1. Todos os animais experimentais foram clinicamente examinados 24 horas antes e, diariamente, após a ingestão da planta.

As amostras do fígado foram coletadas através de biopsias pelo método de punção transtorácica usando-se agulha de Menghini (Braga et al. 1985). Cada amostra foi subdividida em duas porções, uma fixada em formol a 10%, embebida em parafina, cortada e corada por hematoxilina-eosina (HE), von Kossa e ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação

histológica e a outra foi subdividida em fragmentos fixados por imersão em glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% com tampão de cacodilato de sódio (pH 7,4) a ser utilizada para avaliação ultra-estrutural. Os fragmentos foram lavados em solução tampão com sacarose, pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio, desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos em Epon. Os cortes semi-finos foram corados com azul de metileno e áreas selecionadas foram cortadas com navalha de diamante, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão. As biopsias foram realizadas antes da administração da planta, no 1º, no 3º e no 7º dias após a administração. A primeira biopsia foi tomada como controle.

Quadro 1. Dosagens utilizadas na intoxicação experimental por *Myoporium laetum* em ovinos e bovinos

	Ovinos		Bovinos	
Dose única (g/kg)	20	30	20	30
Primavera de 2000	2	-	-	-
Verão de 2001	1	2	3	3
Total	3	2	3	3

## RESULTADOS

### Ovinos

**Sinais clínicos.** Embora em diferentes níveis de severidade, todos os ovinos que receberam a planta, independentemente da dosagem, apresentaram depressão, ausência ou diminuição dos movimentos ruminais, fezes ressequidas com muco e sangue, mucosas vermelhas, tenesmo, ranger de dentes, dispnéia e lesões de fotossensibilização que se caracterizaram, inicialmente, por corrimento seroso ocular e nasal, edema nas orelhas e face, prurido, vermelhidão e, posteriormente, formação de crostas e perda de pêlos ao redor dos olhos e focinho.

**Achados histológicos.** As biopsias obtidas dos dois ovinos dosados em outubro com 20g/kg da planta apresentaram picnose e acidofilia do citoplasma de alguns hepatócitos, especialmente de localização periportal, mas também de alguns da região mediozonal, na verificação feita às 24 horas e, aos 3 e 7 dias após ingestão da planta. As lesões degenerativas evoluíram para necrose com desorganização da arquitetura lobular, hemorragia e discreta basofilia dos hepatócitos na região periportais na coloração de HE, os quais mostravam um fino granulado von Kossa positivo (Fig. 1). Nas biopsias do ovino que recebeu 20g/kg da

planta em janeiro, observaram-se, a partir de 24 horas, vacuolização dos hepatócitos da região centrolobular e acúmulo de neutrófilos no interior de sinusóides. No 3º dia após a dosagem, ainda eram observadas degeneração centrolobular e discreta necrose de alguns hepatócitos na área periportal com eritrócitos extravasados. Moderada fibrose portal e discreta proliferação ductal foram também observadas. No 7º dia, observaram-se vacuolização moderada dos hepatócitos periportais e fibrose portal.

Dos dois ovinos que ingeriram 30g/kg em janeiro, um apresentou sinais clínicos similares aos ovinos intoxicados com 20mg/kg e o outro mostrou sinais muito discretos. Nas biopsias do ovino que apresentou sinais mais evidentes, a partir de 24 horas após a administração da planta, foi verificada vacuolização dos hepatócitos centrolobulares e mediozonais. No 3º dia, foram observadas necrose dos hepatócitos periportais e hemorragia, vacuolização dos hepatócitos centrolobulares e mediozonais, além de discreta proliferação de ductos biliares. No 7º dia foram observadas áreas de necrose periportal com acúmulos de polimorfonucleares nos sinusóides, fibrose e proliferação ductal. Poucos hepatócitos apresentaram um fino granulado basófilo von Kossa positivo, e na coloração de HE foi observada discreta basofilia dos hepatócitos. O outro ovino dosado com 30g/kg apresentou vacuolização difusa dos hepatócitos nas primeiras 24 horas, permanecendo assim durante os 4 e 8 dias. As biopsias controles, ou seja, aquelas tomadas antes do início do experimento não exibiram alterações microscópicas.

**Achados ultra-estruturais.** Nos ovinos que receberam 20g/kg, em outubro, observou-se hiperplasia do retículo endoplasmático liso (REL) nas primeiras 24 horas que se acentuou no 3º dia após ingestão da planta (Fig. 2). Foram encontradas algumas imagens negativas de cristais geralmente em forma de crescente, medindo de 3 a 6µm. No 7º dia foram observados numerosos hepatócitos degenerados caracterizados por tumefação celular, dilatação, degranulação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso (RER), dilatação das mitocôndrias e núcleos com contornos irregulares e cromatina condensada. Em fases mais avançadas, os hepatócitos apresentavam contornos pouco nítidos, ruptura da membrana citoplasmática, núcleos picnóticos, vacuolizações do citoplasma e destruição de organelas. Nas localizações que se mostraram von Kossa-positivas, foram observados hepatócitos degenerados ou necróticos exibindo numerosos grânulos citoplasmáticos eletrodensos com contornos irregulares, medindo 300nm a 2µm, alguns parcial ou totalmente delimitados por membrana, com morfologia compatível com cristais de cálcio (Fig. 3). Em grandes aumentos, esses grânulos mostravam ser constituídos por cristais aciculares de 30 a 40nm (Fig. 4). Algumas células de Kupffer exibiam numerosos corpos residuais no citoplasma.

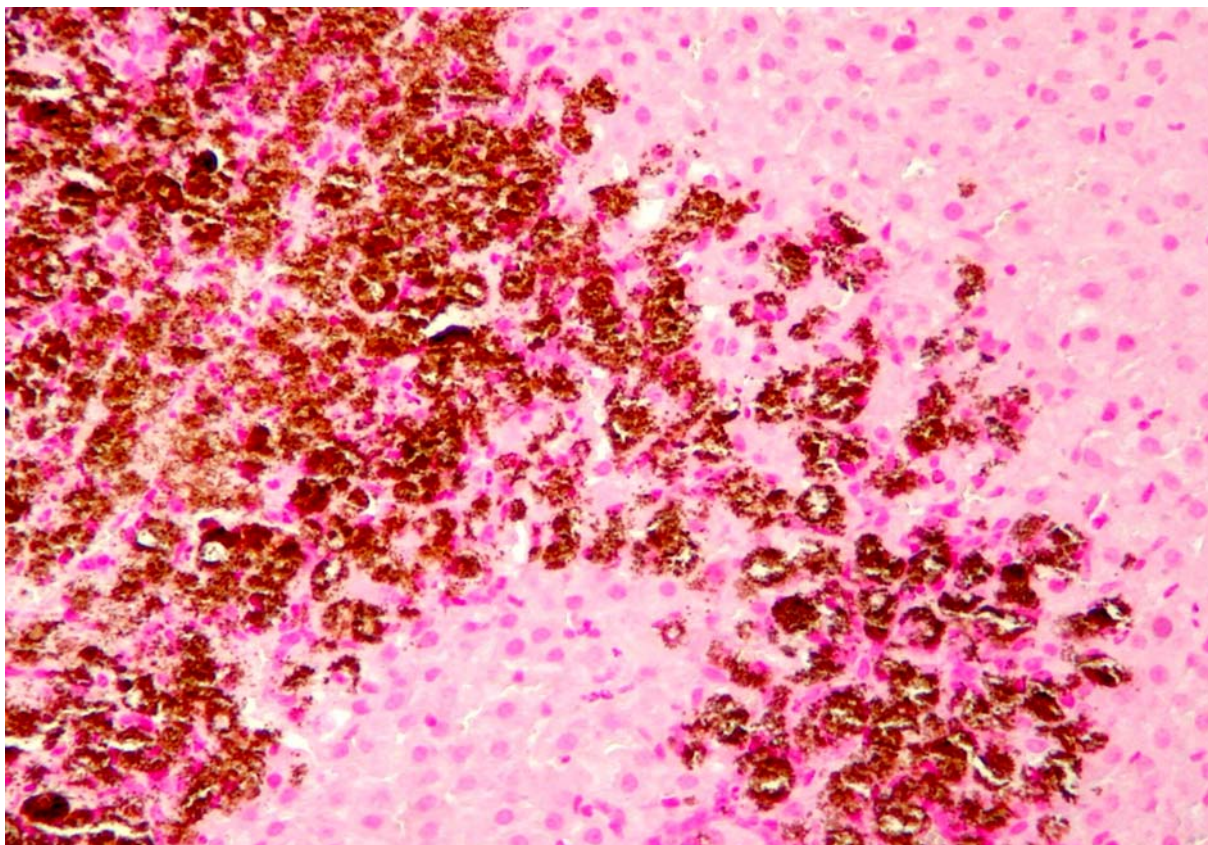


Fig. 1. Intoxicação por *Myoporium laetum*. Fígado. Ovino. Fino granulado von Kossa positivo, obj. 20.

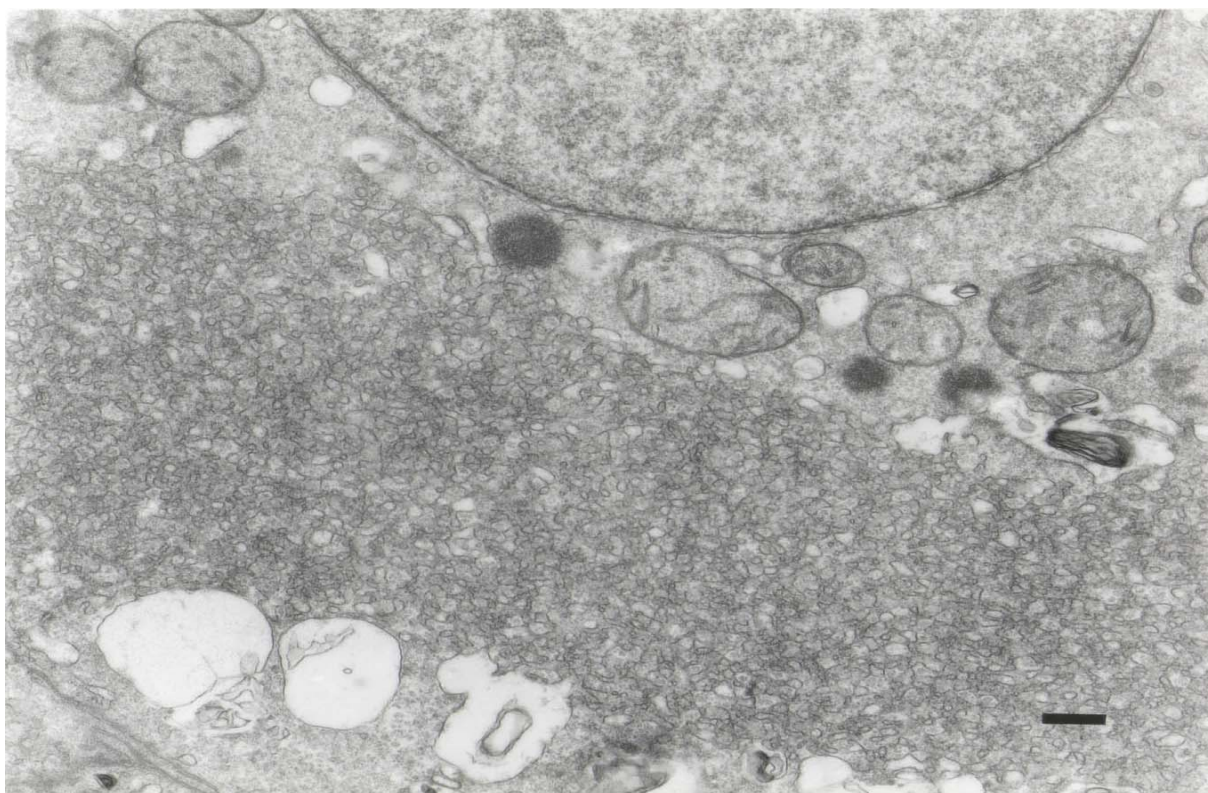


Fig. 2. Micrografia eletrônica. Fígado. Ovino. Hepatócito exibindo acentuada hiperplasia do retículo endoplasmático liso. Barra=0,5 $\mu$ m.

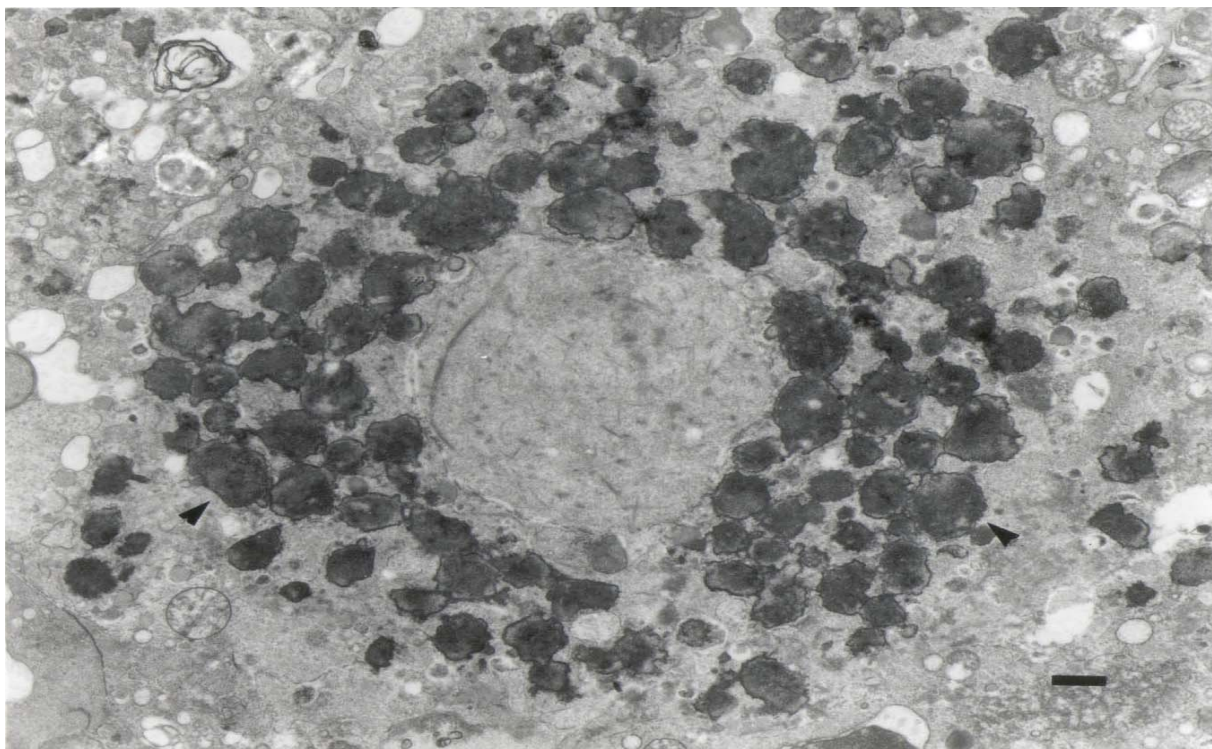


Fig. 3. Micrografia eletrônica. Fígado. Ovino. Hepatócito degenerado mostrando numerosas formações eletrodensas delimitadas por membrana (cabeça de seta). Barra=1 $\mu$ m.

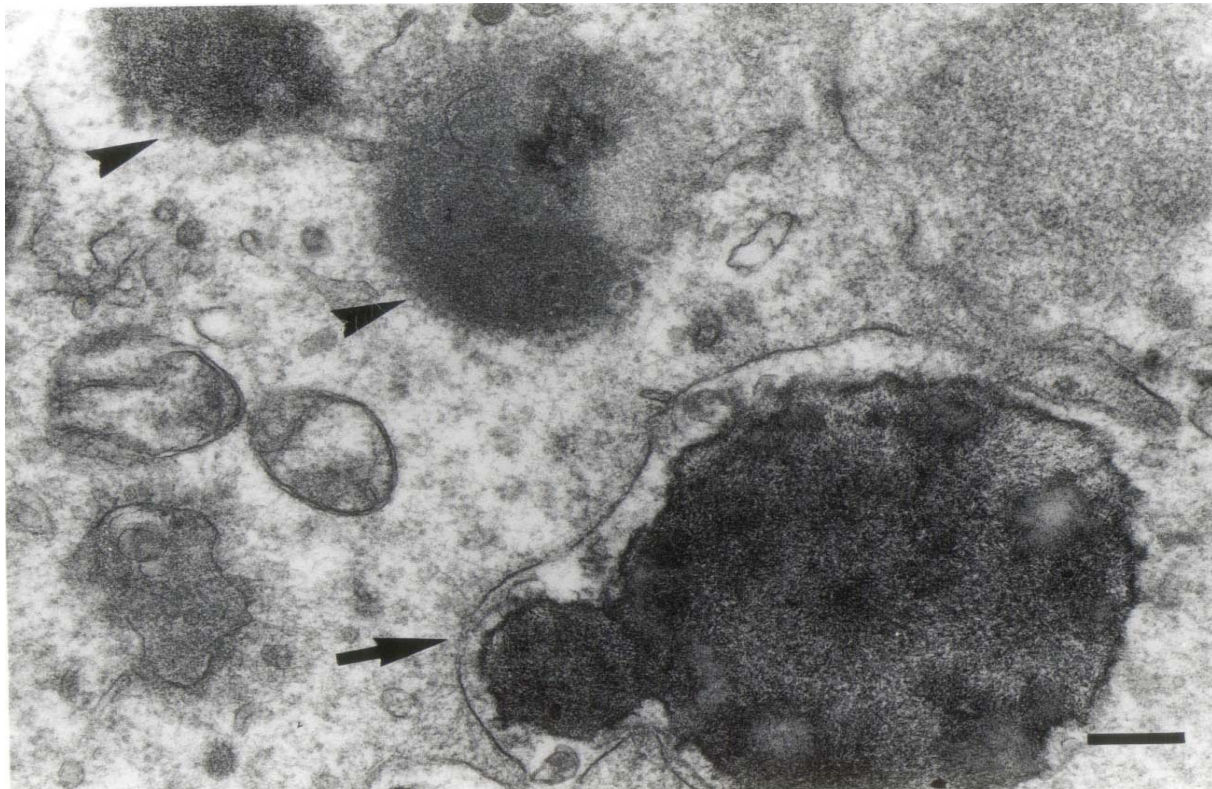


Fig. 4. Micrografia eletrônica. Fígado. Ovino. Maior aumento da Fig. 3. Os grânulos eletrodensos são constituídos por finos cristais aciculares. Dois grânulos estão livres no citoplasma (cabeça de seta) e outro está delimitado por membrana (seta). As mitocôndrias não exibem mineralização. Barra=0,25 $\mu$ m.

No ovino que recebeu 20g/kg no mês de janeiro, verificou-se hiperplasia do REL e aumento significativo dos vacúolos com bile, já nas 24 horas iniciais. Em alguns hepatócitos, havia tumefação de mitocôndrias, algumas com cavitações da matriz. Diversos hepatócitos exibiam núcleos de contornos irregulares e cromatina mais condensada. Essas alterações geralmente estavam acompanhadas de tumefação e degranulação do RER e tumefação das mitocôndrias. As alterações necróticas eram similares às descritas nos ovinos que receberam a planta no mês de outubro. Foi observada a presença de fibrina em alguns espaços de Disse muito dilatados. Em algumas localizações, foram encontradas imagens negativas de cristais, geralmente, em forma de crescente medindo 3 a 6 $\mu$ m. No 3<sup>o</sup> dia após a dosagem, havia acentuada diminuição das cisternas do REL e dos vacúolos com bile. Em muitos desses hepatócitos degenerados, foram vistas vacuolizações irregulares no citoplasma, parcialmente delimitadas por membrana e com um conteúdo, finamente, vesiculoso e, acentuadamente, eletrodense (Fig. 5). No 7<sup>o</sup> dia, acentuou-se ainda mais a diminuição das cisternas do REL, mas o número de vacúolos com bile e as dilatações das cisternas do RER permaneceram inalterados.

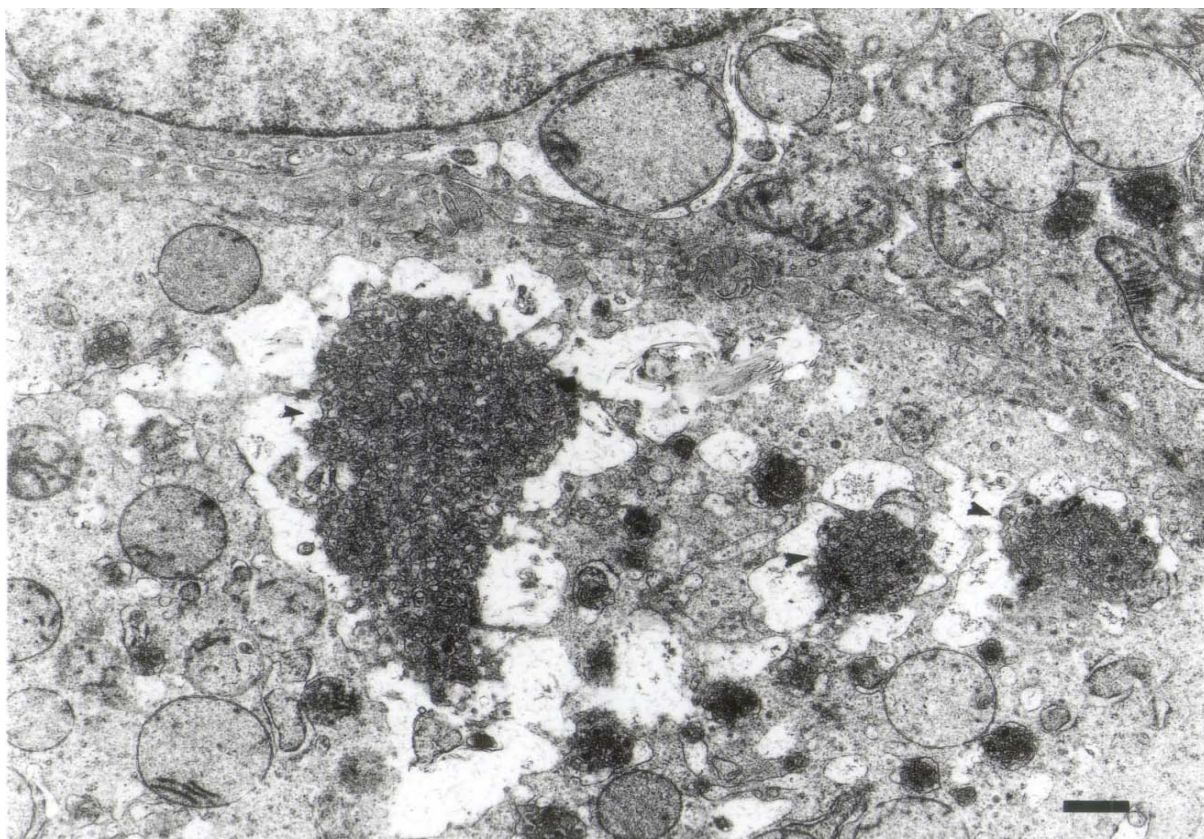


Fig. 5. Micrografia eletrônica. Fígado. Ovino. Hepatócito mostrando estruturas finamente vesiculares e eletrodensas (cabeça de seta) e interpretadas como retículo endoplasmático liso em processo de involução. Na periferia dessas estruturas observam-se espaços claros parcialmente delimitados por membrana. Barra=0,5 $\mu$ m



Nos ovinos que receberam 30g/kg em janeiro foi observado, nas 24 horas, moderado aumento do REL e dos vacúolos com bile, além de algumas gotas de gordura. O RER estava dilatado e com degranulação moderada. No 3º dia após a administração da planta, havia alterações degenerativo-necróticas dos hepatócitos caracterizadas por tumefação, vesiculação e degranulação do RER, vacuolizações do citoplasma, diminuição ou desaparecimento do REL, tumefação e ruptura das mitocôndrias, núcleos com contornos irregulares e cromatina condensada, evoluindo, às vezes, para cariorrexia. Em muitos hepatócitos, observou-se ruptura da membrana celular e liberação do conteúdo citoplasmático no interstício, freqüentemente, acompanhada de eritrócitos extravasados. O endotélio dos capilares sinusóides exibia acentuada dilatação com vacuolizações citoplasmáticas e organelas escassas e mal definidas, embora a membrana basal estivesse, geralmente, bem conservada. Os espaços de Disse, em muitos locais, exibiam restos de organelas de hepatócitos rompidos ou necróticos associados com eritrócitos extravasados e atrofia ou ausência de microvilosidades. No 7º dia, notou-se o desaparecimento dos hepatócitos necróticos e de organelas e eritrócitos do interstício, além de evidentes características de reparação, traduzidos por um significativo incremento do RER e dos ribossomos livres. Tanto os achados microscópicos, quanto os ultra-estruturais observados nos ovinos estão apresentados, resumidamente, no Quadro 2.

## **Bovinos**

**Sinais clínicos.** Nos bovinos que ingeriram 20 e 30g/kg de *Myoporum laetum*, observaram-se depressão, ausência ou diminuição dos movimentos ruminais, fezes amolecidas, mucosas avermelhadas, ranger de dentes e corrimento seroso ocular e nasal.

**Achados histológicos.** Os bovinos que receberam 20 e 30g/kg apresentaram, a partir de 24 horas, hepatócitos com conteúdo citoplasmático finamente granular, PAS-positivo, tornando-se mais evidente do 4º ao 8º dias do experimento. Os hepatócitos, predominantemente, da área periportal mostraram-se corados mais intensamente por PAS.

**Achados ultra-estruturais.** Os fígados dos bovinos que receberam 20g/kg da planta não apresentaram alterações notáveis. Entretanto, constataram-se pequenas diferenças no conteúdo de glicogênio, não só entre os diferentes hepatócitos de um mesmo lóbulo, mas também entre os diferentes dias do experimento. Um discreto aumento do REL foi verificado nos dias 1, 3 e 7 após a dosagem, havendo, entretanto, variabilidade entre os diferentes

Quadro 2. Descrição das alterações histológicas e ultra-estruturais em fígados de ovinos experimentalmente dosados com *Myoporium laetum*

Época	Dosagem		Microscopia Óptica	Microscopia Eletrônica
	Dose (g/kg)	Dias após dosagem		
Primavera 2000	20	1	Picnose e acidofilia citoplasmática de hepatócitos periportais.	Hiperplasia do REL
Primavera 2000	20	3 a 7	Necrose e desorganização da arquitetura lobular. Hemorragia, basofilia do citoplasma de hepatócitos mediozonais, von Kossa positivo.	Hiperplasia acentuada do REL, tumefação de hepatócitos, degranulação e vesiculação do RER, dilatação de mitocôndrias. Contornos citoplasmáticos pouco nítidos, núcleos picnóticos. As áreas von Kossa positivo apresentavam hepatócitos degenerados ou necróticos com numerosos grânulos citoplasmáticos eletrodensos constituídos por cristais aciculares, alguns parcial ou totalmente delimitados por membrana. Células de Kupffer com corpos residuais citoplasmáticos.
Verão 2001	20	1	Vacuolização de hepatócitos centrolobulares e acúmulo de neutrófilos nos sinusóides.	Hiperplasia do REL e retenção biliar. Tumefação e cavitações da matriz de mitocôndrias, núcleos irregulares e cromatina condensada. Tumefação e degranulação do RER. Alterações necróticas similares às previamente descritas. Presença de fibrina em espaços de Disse dilatados. Imagens negativas de cristais.
Verão 2001	20	3	Degeneração centrolobular, necrose de hepatócitos periportais e eritrócitos extravasados. Fibrose portal moderada e proliferação de ductos.	Acentuada diminuição das cisternas do REL e dos vacúolos com bile. Hepatócitos degenerados com vacuolizações citoplasmáticas irregulares, parcialmente delimitadas por membrana e com um conteúdo vesiculoso e eletrodense.
Verão 2001	20	7	Vacuolização moderada hepatócitos periportais e fibrose portal.	Diminuição das cisternas mais evidente ainda.
Verão 2001	30	1	Vacuolização de hepatócitos centrolobulares e mediozonais. Vacuolização difusa.	Hiperplasia do REL, aumento de vacúolos com bile e gotas de gordura. RER dilatado e com degranulação moderada
Verão 2001	30	3	Necrose de hepatócitos periportais e hemorragia, vacuolização de hepatócitos centrolobulares e mediozonais, proliferação de ductos. Vacuolização difusa.	Tumefação, vesiculação e degranulação do RER, vacuolizações do citoplasma, diminuição e desaparecimento do REL, tumefação e ruptura das mitocôndrias, núcleos com contornos irregulares, cromatina condensada e cariorrexia. Liberação do conteúdo citoplasmático no interstício e presença de eritrócitos extravasados nos hepatócitos. Endotélio sinusoidal dilatado, com vacuolizações citoplasmáticas, organelas escassas e mal definidas. Espaços de Disse com restos de organelas de hepatócitos necróticos, eritrócitos extravasados.
Verão 2001	30	7	Necrose periportal, acúmulo de neutrófilos nos sinusóides, fibrose e proliferação de ductos, poucos hepatócitos com fino granulado von Kossa positivo.	Desaparecimento dos hepatócitos necróticos e de organelas e eritrócitos do interstício. Regeneração: incremento do RER e dos ribossomos livres.

hepatócitos de um mesmo lóbulo. A distribuição do RER não estava alterada, bem como o número a distribuição dos ribossomos livres. Foram observados alguns poucos vacúolos contendo bile. A presença e o número desses vacúolos não variaram, significativamente, entre os dias 1, 3 e 7.

Nos bovinos que receberam 30g/kg da planta, foi verificado aumento dos grânulos de glicogênio, em forma de roseta ou monoparticulada, freqüentemente, associados ao REL. Foi observado um discreto aumento do REL no 3º dia, mas que regrediu no 7º dia após receber a planta. A distribuição e o número das cisternas do RER e dos vacúolos com bile não diferiram, substancialmente, durante o experimento.

Todos os ovinos e bovinos utilizados nesse experimento ficaram totalmente recuperados após 20 a 30 dias do experimento.

## DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados nos ovinos deste experimento foram similares aos descritos em observações anteriores (Ragonese 1956, Connor 1977, Allen et al. 1978, Hrdlicka et al. 1978, Raposo et al. 1998a). Em bovinos, os sinais clínicos foram mais discretos.

As lesões microscópicas observadas nos ovinos se caracterizaram, inicialmente, por vacuolização dos hepatócitos centrolobulares e evoluíam principalmente para necrose hepática periportal. Raposo et al (1998a) observaram, principalmente, necrose hepática periportal. Em alguns casos havia, também, hemorragia e, às vezes, a área de necrose se estendia até a região mediozonal. Proliferação de ductos biliares foi também observada. Lesões similares foram descritas em ovinos intoxicados experimentalmente com folhas *M. deserti* (Allen & Seawright 1973) e folhas de *M. tetrandrum* administrada em 3 parcelas dentro de 24 horas. Porém, dose única de folhas de *M. tetrandrum* e óleos de *M. deserti* que levaram a morte dentro de 24 horas, causaram necrose centrolobular (Allen et al. 1978). Portanto, parece que a variação na localização predominante da necrose de hepatócitos está associada à distribuição e atividade das MMFO hepáticas.

A hiperplasia acentuada do retículo endoplasmático liso foi a primeira alteração ultra-estrutural encontrada nos ovinos e foi interpretada como resposta do mecanismo de detoxificação hepática. A hiperplasia do REL parece ter sido mais acentuada nos animais que receberam 20g/kg do que nos que receberam 30g/kg. O REL é a organela ativa na biotransformação de drogas não-polares, através do sistema das oxidases de função mista da

citocromo P-450 (Marzella & Trump 1991). Tem sido demonstrado que diferentes rebanhos de ovinos podem apresentar diferentes níveis de atividade média de suas oxidases de função mista microssomal (MMFO), e que a atividade das enzimas sob condições de campo pode variar com a estação do ano e com a dieta (Seawright et al. 1978). Supõe-se, que as discrepâncias entre as lesões que ocorreram nos ovinos deste estudo possam estar associadas a fatores individuais dos animais, incluindo aquelas inerentes à atividade das MMFO hepáticas no momento da administração da planta tóxica.

As imagens negativas de cristais, semelhantes às observadas em casos envolvendo plantas que contém saponinas (Driemeier et al. 1998), devem ser atribuídas, provavelmente, à presença de sapogeninas no *Myoporum* sp. No entanto, não há relatos da presença de saponinas em *Myoporum laetum*. É provável ainda que a presença destes cristais, semelhantes aos encontrados em animais que ingerem *Brachiaria* spp (Driemeier et al. 1998), estejam relacionados com a patogenia da fotossensibilização. Os grânulos basofílicos encontrados no citoplasma dos hepatócitos degenerados e necróticos e que na ultra-estrutura eram compostos por agregados cristalinos, são sais de cálcio, o que foi confirmado pelo método de von Kossa. Essas formações cristalinas livres no citoplasma ou delimitadas por membrana, em alguns hepatócitos ainda viáveis, sugerem um processo de calcificação intracelular não associado a mitocôndrias. Desde que a manutenção da energia mitocondrial normal é essencial para manter o potencial que dirige a tomada de cálcio, os depósitos de cálcio podem teoricamente se formar em células viáveis. Outra possibilidade é a formação de depósitos de cálcio em células não-viáveis como consequência do equilíbrio osmótico alterado em células necróticas. Portanto, os depósitos iniciais de cálcio podem surgir na célula, agindo como centros de nucleação que, posteriormente, recebem precipitados adicionais formando cristais de cálcio (Marzella & Trump 1991). Notável, também foi a rápida reparação do parênquima hepático aos 8 dias, observada mesmo em animais com acentuadas alterações degenerativo-necróticas. As estruturas finamente vesiculares e acentuadamente eletrodensas observadas, foram interpretadas como agrupamentos de cisternas do REL em processo de involução, secundário à hiperplasia observada 24 horas após a dosagem com a planta.

As lesões verificadas em bovinos dosados com 20-30 g/kg da planta foram apenas discretas sem um padrão definido de necrose, o que poderia ser atribuído a variações individuais ou à concentração do princípio tóxico da planta. Raposo et al (1998b) observaram em um bovino que morreu após ter ingerido 40g/kg de *M. laetum*, necrose centrolobular hemorrágica e vacuolização do citoplasma dos hepatócitos circunjacentes. Em outros seis

bovinos que receberam a mesma dose e não morreram, nas biopsias hepáticas observaram, também, principalmente necrose centrolobular, sendo às vezes, hemorrágica e, em alguns casos, estendendo-se até a área mediozonal. Descrições semelhantes foram feitas por Allen et al. (1978), em terneiros dosados com folhas *M. tetrandrum* ou óleos de *M. deserti*. Quando estes autores usaram pré-tratamentos com fenobarbital e óleo de *Melaleuca linariifolia*, que acentuam a atividade das MMFO hepáticas, observaram necrose periportal. Eles concluíram que a zona de localização da lesão na intoxicação por *Myoporum* estava relacionada à prévia utilização das MMFO hepáticas induzidas por compostos alimentares. Outros autores observaram em casos espontâneos necrose hemorrágica mediozonal (Odriozola et al. 1987) e periportal (Jerrett & Chinnock 1983), e necrose periportal em estudos experimentais (Ford & Rivera 1978, Jerrett & Chinnock 1983). A ocorrência de intoxicação por *Myoporum* sp ou outras por substâncias hepatotóxicas está na dependência de sua metabolização a metabólitos intermediários pelo fígado os quais são hepatotóxicos. A biotransformação destes tóxicos é feita através das MMFO hepáticas, as quais ocorrem em maior concentração na zona centrolobular, em concentração intermediária na mediozonal e em menor concentração na região periportal (Kelly 1993).

Nesse trabalho observou-se ainda que os bovinos demonstraram menor sensibilidade aos efeitos de *Myoporum laetum*. Esse fato provavelmente está associado a uma menor atividade das enzimas microssomais hepáticas nesta espécie o que já havia sido, anteriormente, observado (Allen et al. 1978, Raposo et al. 1998b).

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX) pelo suporte financeiro. Aos laboratoristas Simone Silveira da Silva (Microscopia Eletrônica) e João Francisco Nunes (Histopatologia) do Departamento de Patologia Animal (FV-UFPel).

## REFERÊNCIAS

Allen J.G. & Seawright A.A. 1973. The effect of prior treatment with phenobarbitone, dicophane (DDT) and  $\beta$ -diethylaminoethylphenylpropyl acetate (SKF 525 A) on experimental intoxication of sheep with the plant *Myoporum deserti*. Cunn. Res. Vet. Sci. 15:169-179.

- Allen J.G., Seawright A.A. & Hrdlicka J. 1978. The toxicity of *Myoporum tetrandrum* (Boobialla) and myoporaceous furanoid essential oils for ruminants. *Aust. Vet. J.* 54:287-292.
- Braga M. B., Castilhos L.M.L. & Santos M.N. 1985. Biopsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. *Revta Centro Ciênc Rurais.* 15(1):79-88.
- Connor H.E. 1977. *The Poisonous Plants in New Zealand.* Keating, Government Printer, Wellington, New Zealand, p. 128-131.
- Driemeier D., Barros S.S., Peixoto P.V., Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Brito M.F. 1998. Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos ("foam cells"). *Pesq. Vet. Bras.* 29-34.
- Ford E.J.H. & Rivera R. 1978. The modification of the dehydromyodesmone-induced hepatic lesion in cattle by microsomal drug metabolizing enzymes. *J. Comp. Path.* 88:365-380.
- Hrdlicka J., Seawright A.A., Allen J.G. & Hastie J. 1978. The toxicity of Myomontanone, a lung-damaging furanosesquiterpene from *Myoporum montanum*, p. 465-462. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. (ed.) *Effects of Poisonous Plants on Livestock.* Academic Press, New York.
- Hurst E. 1942. *Poison Plants of New South Wales.* Poison Plants Committee, New South Wales, Sydney, p. 383-391.
- Jerrett I.V. & Chinnock R.J. 1983. Outbreaks of photosensitization and deaths in cattle due to *Myoporum af. insulare*. *R. Br. toxicity Aust. Vet. J.* 60:183-186.
- Kelly W.R. 1993. Liver and biliary system, p. 382-388. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed) *Pathology of Domestic Animals.* Vol. 2. 4<sup>th</sup>. Academic Press, San Diego, California.
- Marzella L. & Trump B.J. 1991. Pathology of the liver: functional and structural alterations of hepatocyte organelles induced by cell injury, p. 93-138.. In: Meeks R.G., Harrison S.D. & Bull R.J. (ed.) *Hepatotoxicology.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Méndez M.C. 1993. Intoxicação por *Myoporum* spp., p. 79-84. In: Riet-Correa F., Méndez M.C. & Schild A.L.(ed.) *Intoxicações por Plantas e Micotoxícoses em Animais Domésticos.* Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, Uruguai.
- Odriozola E.R., Tapia M.O., López T.A., Casaro A.P. & Calandra W. 1987. Intoxicación natural de bovinos con transparente (*Myoporum laetum* Forst.). *Revta. Med. Vet., Buenos Aires,* 68 (4):230-232.
- Ragonese A.E. 1955. *Plantas Tóxicas para el Ganado.* *Revta. Fac. Agronomía, La Plata.* 31(2):279-281.

- Raposo J.B., Méndez M.C., Riet-Correa F. & Andrade G.B. 1998a. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in sheep. *Vet. Human Toxicol.* 40 (3):132-135.
- Raposo J.B., Méndez M.C., Andrade G.B & Riet-Correa F. 1998b. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in cattle. *Vet. Human Toxicol.* 40 (5):275-277.
- Seawright A.A. 1968. Pattern of liver caused by ngaione in the rat. *Aust. Vet. J.* 44:426.
- Seawright A.A. & O'Donahoo M. 1973. Light- and electron-microscope observations of the liver of the mouse after a single oral dose of ngaione. *J. Path.* 106:251-259.
- Seawright A.A., Lee J.S., Allen J.G. & Hrdlicka J. 1978. Toxicity of *Myoporum* spp. and their furanosesquiterpenoid essential oils., p. 241-250. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. (ed.) *Effects of Poisonous Plants on Livestock*. Academic Press, New York.

### **3 CAPITULO 2**

Observações clínicas e bioquímicas em ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por

*Myoporum laetum*

Artigo aceito para publicação: PUB 574 AO 32(1), em 9 de abril de 2004 na Revista Acta  
Scientiae Veterinariae da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



**OBSERVAÇÕES CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS EM OVINOS E BOVINOS  
INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Myoporum laetum* \***

Clinical and biochemical findings in *Myoporum laetum* experimentally poisoned sheep and cattle.

Josiane Bonel-Raposo<sup>6,ψ</sup>, Cristina Gevehr-Fernandes<sup>2</sup>, Carmem Baialardi<sup>2</sup>, David Driemeier<sup>3</sup>

**RESUMO**

A hepatotoxicidade causada por *Myoporum laetum* pode ser detectada por avaliação sérica pela elevação dos níveis de AST, GGT e bilirrubina total. Doses únicas de 20 e 30g/kg de *Myoporum laetum* foram administradas a sete ovinos e 6 bovinos. Amostras de sangue e biopsias hepáticas foram obtidas destes animais e de 4 ovinos e 3 bovinos controles, antes e 1, 3 e 7 dias após a administração da planta. A partir das amostras de sangue analisaram-se os níveis séricos de GGT, AST e bilirrubina total. As biopsias foram processadas e coradas conforme rotina para histologia. Nos ovinos, os níveis enzimáticos de AST, GGT e bilirrubina total elevaram-se 24 horas após a administração da planta, praticamente em todos os animais experimentais, mas não nos controles. Os principais achados histológicos, em ovinos, incluíram vacuolização de hepatócitos, fibrose portal, proliferação de ductos biliares e necrose de hepatócitos periportais. Em bovinos, tanto as alterações na bioquímica sérica como os achados histológicos foram menos evidentes. Os achados referentes à evolução da doença, avaliando-se os sinais clínicos, atividade enzimática e alterações histopatológicas foram compatíveis.

**Descritores:** Plantas tóxicas, alterações hepáticas, *Myoporum laetum*, bovinos, ovinos.

---

\* Trabalho originado da Tese de Doutorado do primeiro autor (Especialidade Patologia)<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).<sup>2</sup> Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).<sup>3</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária de Porto Alegre UFRGS.

<sup>ψ</sup>CORRESPONDÊNCIA: J. Bonel-Raposo [ [bonel-raposo@brturbo.com](mailto:bonel-raposo@brturbo.com) ; Fax +55 53 2757310].

## ABSTRACT

The hepatotoxic effects caused by *Myoporum laetum* may be early detected through seric evaluation, in which the levels of AST, GGT and total bilirubin are increased. A total of 7 sheep and 6 steers were dosed just once with 20 or 30g/kg of green leaves of *Myoporum laetum*. Blood samples and hepatic biopsies were taken before and 1, 3 and 7 days after dosage. . In sheep the serum levels of AST, GGT and total bilirubin increased even before 24 hours after dosing the plant in all experimental animals, except for the controls. Histological findings in sheep included hepatocyte vacuolization, portal fibrosis, proliferation of biliary ducts and necrosis of periportal hepatocytes. In cattle both, the serum enzymatic activity and histological changes, were less evident. Concerning disease evolution, there was positive correlation between clinical signs, enzymatic activity and histological changes.

**Key words:** Poisonous plants, hepatic lesions, cattle, sheep.

## INTRODUÇÃO

A dosagem de enzimas hepáticas no soro permite avaliar o grau de disfunção hepatocelular no decurso de hepatopatias. Em condições normais, há um gradiente de concentração enzimática entre o interior e o exterior das células, cuja manutenção exige um grande dispêndio de energia. Assim, danos mínimos nas células, sejam por distúrbios de suprimento de energia, seja por aumento de permeabilidade da membrana, já acarretam um "vazamento" de enzimas para o espaço extracelular. O grau de elevação dessas enzimas no soro é proporcional à gravidade e extensão da lesão [16].

A avaliação do perfil bioquímico é complexa tanto quando aplicada a rebanhos quanto a indivíduos, devido aos mecanismos que controlam o nível sanguíneo de vários metabólitos e à grande variação desses níveis em função de fatores como raça, idade, stress, dieta, manejo, clima e estado fisiológico, entre outros [6].

A atividade sérica de enzimas de origem hepática tais como gama-glutamilttransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e concentrações séricas de bilirrubina são adotadas para o diagnóstico de alterações hepáticas em seres humanos e animais domésticos. Parece existir uma correlação funcional entre a elevação dos parâmetros referidos, a caquexia, a falta de apetite e o estado progressivo de injúria hepática [9].

A natureza da patologia hepática, se necrótica ou colestática, pode ser determinada pela análise simultânea da atividade sérica das enzimas ALT e GGT, porém ruminantes apresentam pouca atividade hepática de ALT. A AST só pode ser utilizada para avaliar o grau de necrose hepática se não ocorrerem simultaneamente outras doenças não hepáticas. Então, resta a avaliação da GGT que tem grande vantagem para o diagnóstico de colestase em ruminantes, por ser uma enzima originária do tecido biliar hepático. O aumento da atividade sérica da GGT associa-se somente com colestase intra e extra-hepática e dano de ductos biliares. Em ovinos é mais adequada para diagnosticar lesões leves de intoxicações hepáticas agudas e crônicas [9].

A intoxicação por *Myoporum laetum*, cujos princípios tóxicos são óleos essenciais furanosesquiterpenóides (FSTs), dentre os quais cita-se o ngaione [12, 18,19], caracteriza-se por marcada elevação dos níveis séricos de AST e GGT, tanto nas intoxicações espontâneas ou experimentais, com a planta ou com óleos FSTs [1, 2, 5, 7, 13, 14]. Aumento de bilirrubina total (BT) também foi observado em condições experimentais [1, 2, 13, 14].

As lesões microscópicas observadas em ovinos são principalmente necrose hepática periportal, embora lesões mediozonais e centrolobulares possam ocorrer [1, 13]. Nos bovinos, as principais lesões localizam-se no fígado e caracterizam-se por necrose hemorrágica periportal [7]; necrose difusa ou mediozonal [12], com proliferação de ductos biliares [7, 12]. No entanto, em intoxicações experimentais demonstrou-se principalmente necrose hemorrágica centrolobular [2]. As lesões histológicas descritas em bovinos caracterizaram-se principalmente por necrose hepática centrolobular e, em alguns casos, estendendo-se até a área mediozonal [14].

A severidade e o padrão das lesões hepáticas e alterações bioquímicas que resultam da exposição natural à estas hepatotoxinas dependem da soma das diversas variáveis da planta e de reações metabólicas iniciadas por episódios de intoxicação [8]. A variação nos padrões de lesão dessas intoxicações sugere que o tipo e a localização do dano hepático podem ser influenciados por vários fatores como a espécie da planta, o componente de óleo essencial, as espécies e sexo dos animais experimentais ou a atividade das enzimas microssomais hepáticas [5].

No sentido de se avançar na compreensão da patogenia e caracterização das lesões na intoxicação por FSTs, realizou-se a intoxicação experimental com *Myoporum laetum* em ovinos e bovinos, observando principalmente as alterações dos níveis séricos de algumas enzimas e correlacionando-as com os diferentes graus e padrões de lesões hepáticas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Onze ovinos Corriedale e 9 bovinos mestiços foram pesados, mantidos em jejum durante 24 horas e utilizados neste experimento conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Dosagens utilizadas na intoxicação experimental por *Myoporum laetum* em ovinos e bovinos nos meses de outubro, dezembro e janeiro.

Época do ano	Ovinos			Bovinos		
	20*	30*	Controle	20*	30*	controle
Outubro	2	-	1	-	-	-
Dezembro	2	-	1	-	-	-
Janeiro	1	2	2	3	3	3
Total	5	2	4	3	3	3

\*Dose única (g/kg de peso vivo)

As amostras de *Myoporum laetum* foram colhidas durante os meses de outubro, dezembro e janeiro, mantidas sob refrigeração por 12 horas e administradas aos animais conforme esquema de dosagens apresentado na Tabela 1. Durante o experimento todos animais experimentais, inclusive controles foram clinicamente examinados 24 horas antes e diariamente após a ingestão da planta. Todos os animais após receberem a dose única da planta, e os controles eram alimentados diariamente com ração comercial e após soltos em um potreiro. No dia 0, e nos dias 1, 3 e 7 do experimento foram realizadas biopsias e coleta de sangue.

Amostras de fígado foram coletadas através de biopsias hepáticas pelo método de punção transtorácica com agulha de Menghini [4]. Foram fixadas em formol a 10%, incluídas em parafina, cortadas e coradas por hematoxilina-eosina, von Kossa e ácido periódico de Schiff (PAS), para avaliação histológica.

Amostras de sangue foram coletadas através de punção da jugular e acondicionadas em tubos Vacuntainer<sup>1</sup>. Foram enviadas ao serviço de análises clínicas<sup>2</sup> imediatamente após a coleta, para avaliar a atividade sérica das enzimas GGT e AST e a concentração de BT através do Método Cinético Enzimático Automatizado<sup>3</sup>.

Os resultados obtidos das mensurações séricas de AST, GGT e BT sofreram análise estatística, e foram inicialmente resumidos através de seus valores de média e desvio padrão. Para comparações entre as diferentes situações experimentais, foi empregada análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey para a localização das possíveis diferenças.

## **RESULTADOS**

### **Ovinos**

Os ovinos do grupo controle (E-151, E-183, E-184 e E-202) não apresentaram alterações clínicas, bioquímicas ou histológicas.

#### Sinais clínicos

Os sinais clínicos foram similares nos ovinos que receberam 20g/kg ou 30g/kg de planta, embora em diferentes níveis de severidade. Todos os ovinos apresentaram depressão, ausência ou diminuição dos movimentos ruminais, fezes ressequidas com muco e sangue, mucosas vermelhas, tenesmo, ranger de dentes, dispnéia e fotossensibilização.

#### Análise histológica

Nas biopsias obtidas dos ovinos (E-150, E-185, E-186, E-203, E-204) dosados com 20g/kg da planta, observaram-se no dia 2 do experimento degeneração e necrose centrolobular, por vezes a mediozonal. No 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia, as lesões degenerativas evoluíram para necrose com desorganização da arquitetura lobular, hemorragia e discreta basofilia dos hepatócitos na região periportal, os quais mostravam um fino granulado von Kossa-positivo. Em alguns ovinos observou-se evolução para marcada necrose periportal, podendo também ser notada fibrose discreta a moderada.

Nas biopsias de um dos ovinos (E-146) que ingeriu 30g/kg, observou-se no primeiro dia após a administração da planta vacuolização dos hepatócitos centrolobulares e mediozonais. No 3º dia, foi observada necrose dos hepatócitos periportais e hemorragia, vacuolização dos hepatócitos centrolobulares e mediozonais, além de discreta proliferação de ductos biliares. No dia 7, foram observadas áreas de necrose periportal com acúmulos de polimorfonucleares nos sinusóides, fibrose e proliferação ductal. Poucos hepatócitos apresentaram um fino granulado basófilo von Kossa-positivo. O outro ovino (E-147) dosado com 30g/kg apresentou vacuolização difusa dos hepatócitos nas primeiras 24 horas, permanecendo assim durante o 3º e 7º dia após a dosagem da planta.

#### Avaliação do perfil bioquímico

Os resultados individuais dos níveis séricos de AST, GGT e BT de cada animal experimental constam na Tabela 2 e Figura 1.

Os níveis enzimáticos de AST, GGT e bilirrubina total elevaram-se a partir de 24 horas após a administração da planta, praticamente em todos os animais experimentais, com exceção dos controles.

Para o emprego de ANOVA para medidas repetidas, foram considerados os seguintes fatores: -Dias (0, 1, 3 e 7): medida repetida – fator “dentro” dos sujeitos;

-Grupo (Controle, 20g/kg e 30g/kg): grupos independentes – fator “entre” os sujeitos.

A análise descrita acima foi repetida para ovinos e bovinos e, em cada caso, para os resultados de AST, GGT e BT.

No caso dos ovinos, os dados foram transformados através do logaritmo natural, para reduzir a heterogeneidade das variâncias entre os grupos, conforme explicado nas análises que seguem.

Tabela 2. Valores de AST, GGT e bilirrubina total em ovinos controles e intoxicados experimentalmente com 20 e 30g/kg de *Myoporum laetum*

Ovino n <sup>o</sup>	AST (U/l)				GGT (U/l)				BT (mg/dl)			
	0	1	3	7	0	1	3	7	0	1	3	7
151 <sup>a</sup>	126	146	164	128	58	55	62	63	0,55	0,64	0,33	0,53
183 <sup>a</sup>	170	186	154	142	63	66	66	72	0,34	0,48	0,52	0,50
184 <sup>a</sup>	104	200	184	126	63	76	81	82	0,38	0,33	0,37	0,50
202 <sup>a</sup>	150	142	162	146	53	51	55	63	0,43	0,29	0,23	0,22
150 <sup>b</sup>	120	1409	2482	777	57	254	385	322	0,55	1,16	4,17	0,55
185 <sup>b</sup>	106	544	1419	531	76	109	319	224	0,24	0,37	0,51	0,54
186 <sup>b</sup>	118	146	662	304	85	102	147	166	0,18	0,45	0,43	0,45
203 <sup>b</sup>	130	545	3710	1250	65	277	472	536	0,47	0,78	3,53	0,25
204 <sup>b</sup>	117	735	1750	529	54	97	272	239	0,43	0,17	0,21	0,15
146 <sup>c</sup>	107	1353	2296	852	56	186	376	537	0,57	0,96	4,11	1,02
147 <sup>c</sup>	109	233	634	270	57	136	149	144	0,57	0,85	0,61	0,58

a - ovinos controles

b - ovinos intoxicados com 20g/kg de *M. laetum*

c - ovinos intoxicados com 30g/kg de *M. laetum*

### Valores de AST

Conforme os desvios-padrão calculados, os valores de AST apresentam alta variabilidade entre os grupos, com exceção do grupo controle e antes da administração da planta (dia 0). Esta alta variabilidade, pode também ser observada na Figura 1.



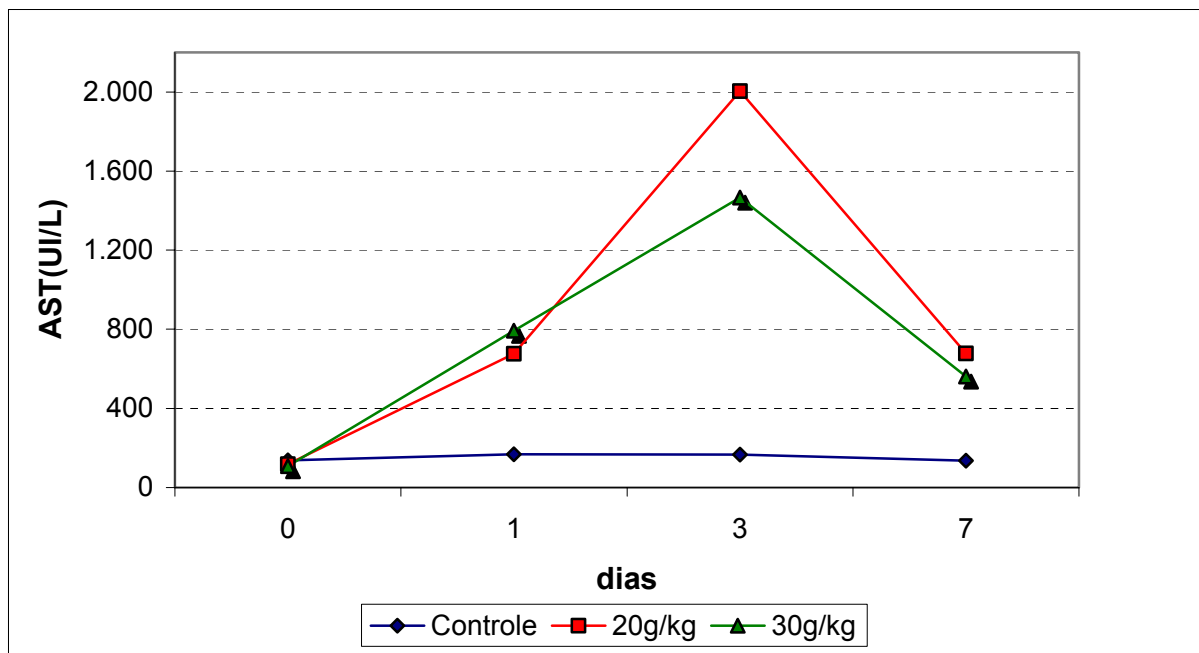


Figura 1. Médias de AST (UI/L) nos dias 0, 1, 3 e 7, para os grupos controles, 20g/kg e 30g/kg em ovinos.

No teste multivariado, avaliando os efeitos dos dias e da interação entre dia e grupos de AST, observou-se que há diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de AST nos diferentes dias testados ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, há efeito significativo da interação entre dias e grupo ( $p = 0,002$ ). Nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg), observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de AST ( $p = 0,007$ ).

Na comparação entre os dias, com exceção dos resultados do 1º e do 7º dias, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de AST ( $p=1,000$ ), todos os outros dias diferiram significativamente entre si.

No teste de Tukey entre grupos, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a atividade média de AST nos grupos de 20g/kg e 30g/kg ( $p = 0,896$ ). O grupo controle diferiu significativamente destes dois grupos ( $p = 0,007$  e  $p = 0,047$ , respectivamente para os grupos de 20g/kg e 30g/kg).

### Valores de GGT

Os resultados de GGT apresentaram, também, alta variabilidade nos resultados dos grupos controle, 20g/kg e 30g/kg, e nos dias 0, 1, 3 e 7. No teste univariado (assumindo esfericidade), observou-se que há diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de GGT nos diferentes dias testados e na interação entre dias e grupo ( $p < 0,001$ ).

Na comparação múltipla entre os dias, com exceção dos resultados do 3º dia e do 7º dias, que não apresentam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de GGT ( $p = 1,000$ ), todos os outros dias diferiram significativamente entre si.

Nas comparações múltiplas de Tukey observou-se que há diferença estatisticamente significativa entre os valores médios da atividade de GGT nos grupos de 20g/kg e 30g/kg ( $p = 0,942$ ). O grupo controle difere significativamente destes dois grupos ( $p = 0,002$  e  $p = 0,016$ , respectivamente para os grupos de 20g/kg e 30g/kg).

### Valores de BT

Os resultados dos valores de média, desvio-padrão e nº de casos observados, para os resultados de BT nos grupos controle, 20g/kg e 30g/kg, nos dias 0, 1, 3 e 7, no teste de homogeneidade de variâncias (Teste de Levene) indicam heterogeneidade das variâncias para os valores dos dias 0 e 3 para um nível 5%. Os valores do dia 1 podem ser considerados com variâncias heterogêneas, para um nível de significância de 10%.

No teste univariado (assumindo esfericidade) não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de BT nos diferentes dias testados ( $p = 0,094$ ). Da mesma forma, não houve efeito significativo da interação entre dias e grupo ( $p = 0,282$ ).

No teste sobre o efeito dos grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de BT nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg) ( $p = 0,236$ ).

## **Bovinos**

Os bovinos controles (E-191, E-192 e E-193) não apresentaram sinais clínicos, alterações bioquímicas ou lesões histológicas características da intoxicação.

### Sinais clínicos

Nos bovinos que ingeriram 20g/kg (E-194, E-195 e E-196) e 30g/kg (E-197, E-198 e E-199) de *Myoporum laetum*, observou-se depressão, ausência ou diminuição dos movimentos ruminais, fezes amolecidas, mucosas avermelhadas, ranger de dentes e corrimento seroso ocular e nasal.

### Análise histológica

Os bovinos que receberam 20 e 30g/kg apresentaram, a partir de 24 horas, hepatócitos com discreta vacuolização citoplasmática e presença de conteúdo finamente granular, PAS positivo. Os hepatócitos, predominantemente da área periportal mostraram-se corados mais intensamente pelo PAS (glicogênio). Nos controles, os hepatócitos pareciam conter menor quantidade de glicogênio.

### Avaliação do perfil bioquímico

Os resultados individuais dos níveis séricos de AST, GGT e BT de cada bovino encontram-se na Tabela 3.

Pode-se observar que nos bovinos os níveis séricos de AST e GGT elevaram-se na maioria dos animais experimentais, exceto nos controles. Porém, a BT elevou-se em 1 bovino que recebeu a dose de 20g/kg ,a partir de 24 horas após a administração da planta. Outro bovino que foi dosado com 30g/kg apresentou aumento da BT somente no 3<sup>o</sup> dia do experimento.

A análise estatística foi realizada da mesma forma que para os ovinos, porém não houve necessidade de transformar os dados originais para se obter menor variabilidade e maior homogeneidade. Os resultados mais importantes constam da Tabela 4.

Tabela 3. Valores de AST, GGT e bilirrubina total em bovinos controles e intoxicados experimentalmente com 20 e 30g/kg de *Myoporum laetum*

Bovino n <sup>o</sup>	AST (U/l)				GGT (U/l)				BT (mg/dl)			
	0	1	3	7	0	1	3	7	0	1	3	7
191 <sup>a</sup>	62	71	90	54	16	15	16	17	0,57	0,42	0,51	0,36
192 <sup>a</sup>	90	85	94	79	19	19	24	26	0,64	0,58	0,74	0,49
193 <sup>a</sup>	95	98	77	67	19	24	22	26	0,43	0,35	0,31	0,29
194 <sup>b</sup>	83	82	66	71	17	20	41	48	0,49	0,34	0,37	0,31
195 <sup>b</sup>	55	75	61	39	11	16	19	22	0,55	0,43	0,44	0,27
196 <sup>b</sup>	66	128	53	48	33	26	27	24	0,78	0,82	0,66	0,47
197 <sup>c</sup>	98	117	102	66	23	27	45	47	0,68	0,56	1,21	0,53
198 <sup>c</sup>	57	102	84	77	15	17	20	27	0,45	0,39	0,34	0,29
199 <sup>c</sup>	60	73	96	61	16	15	22	29	0,57	0,41	0,57	0,35

a – bovinos controles

b - bovinos intoxicados com 20g/kg de *M. laetum*

c – bovinos intoxicados com 30g/kg de *M. laetum*

Tabela 4. Valores de média, desvio-padrão e n<sup>o</sup> de casos observados dos resultados de AST nos bovinos controles e intoxicados com 20g/kg e 30g/kg de *M. laetum*, nos dias 0, 1, 3 e 7 após administração da planta.

Dias	Controle	20g/kg	30g/kg	Total
	Média (Desvio-padrão)	Média (Desvio-padrão)	Média (Desvio-padrão)	Média (Desvio-padrão)
0	82,33 (17,79)	68,00 (14,11)	71,67 (22,85)	74,00 (17,35)
1	84,67 (13,50)	95,00 (28,79)	97,33 (22,37)	92,33 (20,30)
3	87,00 (8,89)	60,00 (6,56)	94,00 (9,17)	80,33 (17,12)
7	66,67 (12,50)	52,67 (16,50)	68,00 (8,19)	62,44 (13,34)

### Valores de AST

As médias da AST dos bovinos podem ser melhor visualizadas na Figura 2, para os diferentes dias do experimento.

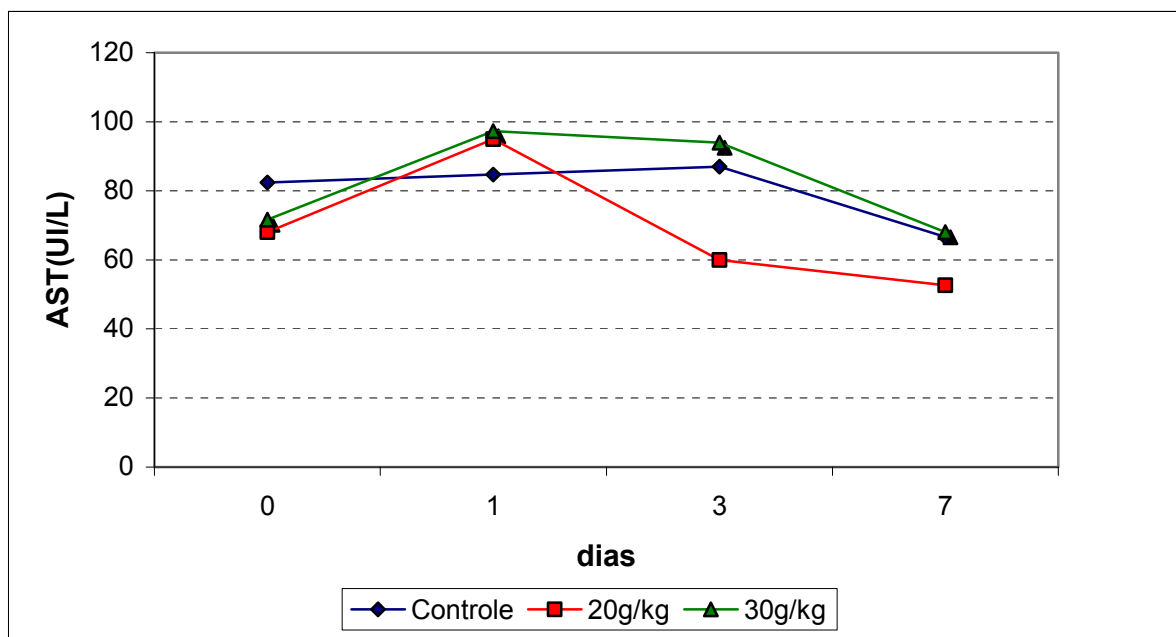


Figura 2. Médias de AST (UI/L) nos dias 0, 1, 3 e 7, para os grupos controle, 20g/kg e 30g/kg em bovinos.

Há diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios da atividade de AST nos dias testados ( $p = 0,004$ ). Já em relação à interação entre dias e grupo, não há efeito significativo ( $p = 0,306$ ).

No teste sobre o efeito dos grupos, observou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de AST nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg) ( $p = 0,302$ ).

Nas comparações entre os dias, observou-se que podem ser considerados estatisticamente diferentes, se aceito um nível de significância pouco acima de 6%, os valores médios de AST nos dias 1 e 7 ( $p = 0,061$ ) e nos dias 3 e 7 ( $p = 0,064$ ). As demais

comparações entre as médias dos dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

#### Valores de GGT

Os valores de média, desvio-padrão e n<sup>o</sup> de casos observados, assim com o teste de Levene para GGT nos grupos controle, 20g/kg e 30g/kg, e nos dias 0, 1, 3 e 7 não tiveram problemas de variabilidade. Em relação à heterogeneidade das variâncias, apenas o resultado do dia 0 (antes da administração da planta) apresentou tendência de heterogeneidade das variâncias ( $p=0,056$ ).

No teste multivariado não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de GGT nos diferentes dias testados ( $p=0,160$ ). Da mesma forma, não houve efeito significativo da interação entre dias e grupo ( $p=0,857$ ).

No efeito sobre grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de GGT nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg) ( $p=0,623$ ).

#### Valores de BT

No teste multivariado houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de BT nos diferentes dias testados ( $p=0,002$ ). Por outro lado, não houve efeito significativo da interação entre dias e grupo ( $p=0,616$ ).

No efeito sobre os grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de BT nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg) ( $p=0,920$ ).

Nas comparações entre os dias, podem ser considerados estatisticamente diferentes, para um nível de significância 5%, os valores médios de BT nos dias 0 e 1 ( $p=0,041$ ) e 0 e 7 ( $p<0,001$ ). As demais comparações entre as médias dos dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

## DISCUSSÃO

Os parâmetros indicativos da função hepática utilizado neste experimento, como AST e GGT aumentaram tanto em ovinos como bovinos, embora nestes últimos a elevação destas enzimas tenha sido mais discreta. Com relação a BT observou-se que nos bovinos houve aumento apenas em 2 animais (1 com 20g/kg e 1 com 30g/kg), enquanto que nos ovinos houve aumento em todos animais experimentais, exceto nos controles. Resultados semelhantes foram relatados previamente por outros autores [1, 2, 5, 7, 13, 14]. AST está presente em muitos tecidos como duas isoformas no citosol e na mitocôndria, sendo um indicativo de danos em tecidos moles, especialmente tecidos cardíacos e hepáticos. Em ruminantes, os níveis séricos de AST servem como um bom indicador do funcionamento hepático [3, 6]. A GGT encontra-se como enzima associada às membranas, mas também está no citosol, especialmente nos epitélios dos ductos biliares e renais. O nível de GGT é muito baixo em cães e gatos, comparado com os níveis nos ruminantes. Quando se apresenta elevado no plasma indica colestase e proliferação de ductos biliares, em todas as espécies. Aumenta também na cirrose e no colangiocarcinoma [3, 6, 7]. O aumento da concentração de bilirrubina no soro tem como causas mais comuns a hemólise e as doenças hepáticas [3].

As lesões microscópicas degenerativas e necróticas encontradas nos ovinos são compatíveis com as descritas previamente [11, 13, 17]. A partir de 24 horas após a dosagem, os sinais clínicos, principalmente, de fotossensibilização foram evidentes, e coincidem com a elevação dos níveis séricos de AST, GGT e BT e com lesões histológicas caracterizadas, inicialmente, por vacuolização dos hepatócitos centrolobular que evoluía para necrose hepática periportal. Esta localização predominante de necrose de hepatócitos está,

provavelmente, associada à distribuição das oxidases de função mista microssomal (MMFO) hepáticas [1]. Supõe-se que como a lesão hepática evoluiu predominante para a área periportal, isso poderia levar a um acúmulo de filoterina por interferência na drenagem canalicular e, conseqüentemente, fotossensibilização hepatógena [15]. Acredita-se que algumas diferenças entre os graus de severidade das lesões que ocorreram nos ovinos deste estudo possam estar associadas a fatores individuais, incluindo a atividade das MMFO hepáticas dos animais no momento da administração, além daquelas inerentes ao estágio vegetativo da planta tóxica. A presença de grânulos basofílicos no citoplasma dos hepatócitos degenerados e necróticos são sais de cálcio, confirmado pelo método de von Kossa. Essas formações cristalinas livres no citoplasma ou delimitadas por membrana, em alguns hepatócitos ainda viáveis, sugerem um processo de calcificação intracelular não associado a mitocôndrias. Uma vez que a manutenção da energia mitocondrial normal é essencial para manter o potencial que dirige a tomada de cálcio, os depósitos de cálcio podem teoricamente se formar em células viáveis. Outra possibilidade é a formação de depósitos de cálcio em células não viáveis, como conseqüência da alteração do equilíbrio osmótico em células necróticas. Portanto, os depósitos iniciais de cálcio podem surgir na célula, agindo como centros de nucleação que, posteriormente, recebem precipitados adicionais formando cristais de cálcio [10].

A avaliação estatística, mostrou que os valores médios de AST, GGT dos grupos de 20g/kg e 30g/kg, nos diferentes dias testados tiveram efeito significativo sobre os grupos, assim como há efeito significativo da interação entre dias e grupo ( $p < 0,001$ ). O efeito de interação indica que os resultados observados ao longo dos dias não seguem o mesmo padrão nos três grupos, tendo-se observado que há diferenças estatísticas significativas entre valores médios de AST e GGT nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg), e que dependendo do tempo (dia) após a administração da planta, os animais experimentais



apresentaram diferentes graus de sinais clínicos ou lesões (alterações). Na comparação múltipla entre os dias, com exceção dos resultados do 1º e do 7º dias em relação aos valores de AST, e do 3º e do 7º dias dos valores de GGT que não apresentam diferença estatisticamente significativa, todos os outros dias diferiram significativamente entre si. Porém, não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de AST, GGT nos grupos de 20g/kg e 30g/kg, enquanto o grupo controle diferiu significativamente destes dois grupos. Os valores médios de BT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes dias testados, na interação entre dias e grupo, e nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg).

Nos bovinos desse experimento dosados com 20 e 30g/kg de folhas frescas da planta, os sinais clínicos e as lesões da intoxicação foram discretos. Embora existam descrições de necrose centrolobular de hepatócitos associada à dosagem de 40g/kg de *Myoporum laetum* [14] e folhas de *M. tetrandrum* ou óleos de *M. deserti* [2], neste estudo as lesões verificadas foram discretas sem um padrão definido de necrose, o que poderia ser, também, atribuído a variações individuais ou à concentração do princípio tóxico da planta no período de sua colheita. Aparentemente, os bovinos demonstraram menor sensibilidade aos efeitos de *Myoporum laetum*. Esse fato provavelmente está, também, associado a uma menor atividade das enzimas microsossomais hepáticas nesta espécie, o que já havia sido observado anteriormente [2, 14]. A análise laboratorial, por outro lado, demonstrou que os níveis séricos de AST, GGT e BT, nos grupos que receberam 20g/kg e 30g/kg de planta elevaram-se até o 3º dia e começavam a diminuir no 7º dia após o consumo da planta. Esses bovinos, apresentaram entre os valores médios tanto de AST quanto BT diferenças estatísticas significativas nos diferentes dias testados, enquanto para GGT esse efeito dia não foi significativo. Porém, não houve efeito significativo em relação à interação entre dias e grupos, assim como também entre os valores médios nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg) para os

valores de AST, GGT e BT. Na comparação dos valores de AST entre os dias, observaram-se diferenças estatísticas, se aceito um nível de significância pouco acima de 6%, nos valores médios de AST dos dias 1 e 7 e também dos dias 3 e 7. As demais comparações entre as médias dos dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Nas comparações dos valores de BT entre os dias, podem ser considerados estatisticamente diferentes, para um nível de significância 5%, os valores médios de BT nos dias 0 e 1 e 0 e 7. As demais comparações entre as médias dos dias para AST e BT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A existência de tantas variáveis envolvidas torna o resultado da exposição natural a estas hepatotoxinas de difícil prognóstico. Tanto a intensidade quanto o padrão das lesões hepáticas dependem da soma das diversas variáveis e das reações metabólicas disparadas por episódios de intoxicação [8].

Após vários estudos experimentais em camundongos, ratos, ovinos e bovinos sugerem-se que o mecanismo patogênico da toxicidade de *Myoporum*, bem como de outras plantas contendo óleos FST, esteja associado com o grau de atividade das MMFO hepáticas no momento da dosagem, com outros fatores individuais do animal e com o estágio vegetativo da planta quando consumida.

## CONCLUSÕES

- a) Em ovinos que consumiram 20g/kg e 30g/kg de folhas frescas de *M. laetum* em dose única, há associação entre os sinais clínicos, lesões hepáticas e a elevação dos níveis séricos de AST, GGT e BT.
- b) A avaliação bioquímica poderia representar um método mais sensível para detectar a intoxicação caso tivesse sido constatada alteração bioquímica antes dos sinais e alterações histológicas: caso tenha sido feito biopsia e dosagem enzimática ambos antes das 24hs, havendo somente alteração nas enzimas neste período.
- c) Embora os bovinos tenham consumido as mesmas doses de planta que os ovinos, apresentaram sinais clínicos e lesões histológicas mais discretas .
- d) A toxicidade da planta está, provavelmente, relacionada à época do ano que foi consumida.

## NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup> Brand – STERILE Interior SST™ Gel and Clot Activator

<sup>2</sup> Laboratório Birck, Análises e Pesquisas Médicas

Farmacêutica Bioquímica: Eliane Birck Lopes CRF 10-3826

<sup>3</sup>Kits Dade Behring, aparelho Dimension AR - fabricante Dade Behring

## REFERÊNCIAS

1. **Allen J.G. & Seawright A.A. 1973.** The effect of prior treatment with phenobarbitone, dicophane (DDT) and  $\beta$ -diethylaminoethylphenylpropyl acetate (SKF 525 A) on experimental intoxication of sheep with the plant *Myoporum deserti*. *Cunn. Research in Veerinary. Science.* 15: 169-179.
2. **Allen J.G., Seawright A.A. & Hrdlicka J. 1978.** The toxicity of *Myoporum tetrandrum* (Boobialla) and myoporaceous furanoid essential oils for ruminants. *Australian Veterinary Journal.* 54: 287-292.
3. **Bogin E., Otto F., Ibáñez A., Lippi E. Wittwer F. & Uriarte G. 1989.** Patología Clínica Veterinária. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica.* Asunción, Paraguay. 192 p.
4. **Braga M. B., Castilhos L.M.L. & Santos M.N. 1985.** Biopsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. *Revista Científica do Centro Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.* 15:79-88.
5. **Ford E.J.H. & Rivera R. 1978.** The modification of the dehydromyodesmone-induced hepatic lesion in cattle by microsomal drug metabolizing enzymes. *Journal Comparative Pathology.* 88: 365-380.
6. **González F.H.D. & Scherer J.F.S. 2001.** Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González F.H.D. (Ed). *Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais.* Porto Alegre. pp. 5-15.

7. **Jerrett I.V. & Chinnock R.J. 1983.** Outbreaks of photosensitisation and deaths in cattle due to *Myoporium* aff insulare. R. Br. Toxicity. *Australian Veterinary Journal*. 60: 183-186.
8. **Kelly W. R. 1993.** Liver and biliary system. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds). *Pathology of Domestic Animals*. 4<sup>a</sup> ed. Academic Press, Inc. California. 2: 382-388.
9. **Lavezzo O.E.N.M., Lavezzo W., Wechsler F.S., Sartori M.S., Rocha G.P., Medina M.K.J & Padovani N. 1996.** Toxicidade hepática em ovinos, induzida pelo consumo de cama de frango em diferentes níveis. In: *Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. (Fortaleza, Brasil). p. 205-207.
10. **Marzella L. & Trump B.J. 1991.** Pathology of the liver: functional and structural alterations of hepatocyte organelles induced by cell injury. In: Meeks R.G., Harrison S.D. & Bull R.J. (Eds). *Hepatotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 93-138.
11. **Méndez M.C. 1993.** Intoxicación por *Myoporium* spp. In: Riet-Correa F., Méndez M.C. & Schild A.L. (Eds). *Intoxicaciones por plantas e micotoxicosas em animales domésticos*. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., Uruguay, pp. 79-84.
12. **Odriozola E.R., Tapia M.O., López T.A. Casaro A.P. & Calandra W. 1987.** Intoxicación natural de bovinos con transparente (*Myoporium laetum* Forst.). *Revista Medicina Veterinaria*, Buenos Aires, 68: 230-232.
13. **Raposo J.B., Méndez M.C., Riet-Correa F., & Andrade G.B. 1998a.** Experimental intoxication by *Myoporium laetum* in sheep. *Veterinary and Human Toxicology*. Manhattan, Kansas, USA, 40: 132-135.
14. **Raposo J.B., Méndez M.C., Andrade G.B. & Riet-Correa F. 1998b.** Experimental intoxication by *Myoporium laetum* in cattle. *Veterinary and Human Toxicology*. Manhattan, Kansas, USA, 40: 275-273.

15. **Rowe L.D. 1989.** Photosensitization problems in livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 5: 301-323.
16. **Santos M.M.A. 2003.** Provas de Função e Lesão Hepática. Monitoria de Clínica Médica FM-UnB.[online]. 5p.
17. **Seawright A.A. 1968.** Patters of liver caused by ngaione in the rat. *Australian Veterinary Journal*. 44: 426.
18. **Seawright A.A., Everist S.L. & Hrdlicka J. 1983.** Comparative features of *Lantana*, *Myoporum*, and *Pimelea* toxicities in livestock. In Keeler RF, Tu AT (Eds): *Handbook of Natural Toxins, Plant and Fungal Toxins*. v. 1, New York, Marcel Dekker. pp. 511-539.
19. **Seawright A.A., Lee J.S., Allen JG & Hrdlicka. 1978.** Toxicity of *Myoporum* spp. and their furanosesquiterpenoid essential oils. In Keeler RF, Van Kampen KR, James LF. *Effects of Poisonous Plants on Livestock*. Academic Press, New York. pp. 241-250.

## 4 CAPITULO 3

### DISCUSSÃO GERAL

Os ovinos deste experimento apresentaram sinais clínicos similares aos relatados em observações anteriores (RAGONESE 1956, CONNOR 1977, ALLEN et al. 1978, HRDLICKA et al. 1978, RAPOSO et al. 1998a). Porém, nos bovinos estes sinais foram mais discretos independente da dosagem da planta de 20 ou 30g/kg.

As lesões microscópicas degenerativas e necróticas encontradas nos ovinos são compatíveis com as descritas previamente (SEAWRIGHT 1968, MÉNDEZ 1993, RAPOSO et al. 1998a). A partir de 24 horas após a dosagem, os sinais clínicos, principalmente, de fotossensibilização foram evidentes, e coincidem com a elevação dos níveis séricos de AST, GGT e BT e com lesões histológicas caracterizadas, inicialmente, por vacuolização dos hepatócitos periacinares que evoluía para necrose hepática periportal. Esta localização predominante de necrose de hepatócitos está, provavelmente, associada à distribuição das oxidases de função mista microssomal (MMFO) hepáticas (ALLEN & SEAWRIGHT 1973). Supõe-se que como a lesão hepática evoluiu predominante para a área periportal, isso poderia levar a um acúmulo de fileritina por interferência na drenagem canalicular e, conseqüentemente, fotossensibilização hepatógena (ROWE 1989). Acredita-se que algumas diferenças entre os graus de severidade das lesões que ocorreram nos ovinos deste estudo possam estar associadas a fatores individuais, incluindo a atividade das MMFO hepáticas dos animais no momento da administração, além daquelas inerentes ao estágio vegetativo da planta tóxica. Os grânulos basofílicos encontrados no citoplasma dos hepatócitos degenerados e necróticos e que na ultra-estrutura eram compostos por agregados cristalinos, são sais de cálcio, o que foi confirmado pelo método de von Kossa. Essas formações cristalinas livres no citoplasma ou delimitadas por membrana, em alguns hepatócitos ainda viáveis, sugerem um processo de calcificação intracelular não associado a mitocôndrias. Desde que a manutenção da energia mitocondrial normal é essencial para manter o potencial que dirige a tomada de cálcio, os depósitos de cálcio podem, teoricamente, se formar em células viáveis. Outra possibilidade é a formação de depósitos de cálcio em células não-viáveis como conseqüência do equilíbrio osmótico alterado em células necróticas. Portanto, os depósitos iniciais de cálcio

podem surgir na célula, agindo como centros de nucleação que, posteriormente, recebem precipitados adicionais formando cristais de cálcio (MARZELLA & TRUMP 1991). A hiperplasia acentuada do retículo endoplasmático liso foi à primeira alteração ultra-estrutural encontrada nos ovinos e foi interpretada como resposta do mecanismo de detoxificação hepática. A hiperplasia do REL parece ter sido mais acentuada nos animais que receberam 20g/kg do que nos que receberam 30g/kg. O REL é a organela ativa na biotransformação de drogas não-polares, através do sistema das oxidases de função mista da citocromo P-450 (MARZELLA & TRUMP 1991). Tem sido demonstrado que diferentes rebanhos de ovinos podem apresentar diferentes níveis de atividade média de suas oxidases de função mista microsomal (MMFO), e que a atividade das enzimas sob condições de campo pode variar com a estação do ano e com a dieta (SEAWRIGHT et al. 1978). Supõe-se, que as discrepâncias entre as lesões que ocorreram nos ovinos deste estudo possam estar associadas a fatores individuais dos animais, incluindo aquelas inerentes à atividade das MMFO hepáticas no momento da administração da planta tóxica. As estruturas finamente vesiculares e acentuadamente eletrodensas observadas, foram interpretadas como agrupamentos de cisternas do REL em processo de involução, secundário à hiperplasia observada 24 horas após a dosagem com a planta.

Os parâmetros indicativos da função hepática como AST, GGT e bilirrubina total elevaram-se, embora em diferentes graus de severidade, tanto em ovinos como em bovinos durante este experimento. O mesmo foi relatado previamente por outros autores (ALLEN & SEAWRIGHT 1973, FORD & RIVERA 1978, ALLEN et al. 1978, JERRETT & CHINNOCK 1983, RAPOSO et al. 1998a,b).

A avaliação estatística, mostrou que os valores médios de AST, GGT dos grupos de 20g/kg e 30g/kg, nos diferentes dias testados tiveram efeito significativo sobre os grupos, assim como há efeito significativo da interação entre dias e grupo ( $p < 0,001$ ). O efeito de interação indica que os resultados observados ao longo dos dias não seguem o mesmo padrão nos três grupos, tendo-se observado que há diferenças estatísticas significativas entre valores médios de AST e GGT nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg), e que dependendo do tempo (dia) após a administração da planta, os animais experimentais apresentaram diferentes graus de sinais clínicos ou lesões (alterações). Na comparação múltipla entre os dias, com exceção dos resultados do 1º e do 7º dias em relação aos valores de AST, e do 3º e do 7º dias dos valores de GGT que não apresentam diferença estatisticamente significativa, todos os outros dias diferiram significativamente entre si.



Porém, não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de AST, GGT nos grupos de 20g/kg e 30g/kg, enquanto o grupo controle diferiu significativamente destes dois grupos. Os valores médios de BT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes dias testados, na interação entre dias e grupo, e nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg).

Nos bovinos existem descrições de necrose centrolobular de hepatócitos associada à dosagem de 40g/kg de *Myoporum laetum* (RAPOSO et al. 1998b) e folhas de *M. tetrandrum* ou óleos de *M. deserti* (ALLEN et al. 1978), entretanto neste estudo as lesões verificadas foram discretas sem um padrão definido de necrose, o que poderia ser, também, atribuído a variações individuais ou à concentração do princípio tóxico da planta no período de sua colheita. Aparentemente, os bovinos demonstraram menor sensibilidade aos efeitos de *Myoporum laetum*. Esse fato provavelmente está, também, associado a uma menor atividade das enzimas microssomais hepáticas nesta espécie, o que já havia sido observado anteriormente (ALLEN et al. 1978, RAPOSO et al. 1998b).

A análise laboratorial, por outro lado, demonstrou que os níveis séricos de AST, GGT e BT, nos grupos que receberam 20g/kg e 30g/kg de planta elevaram-se até o 3º dia e começavam a diminuir no 7º dia após o consumo da planta.

Esses bovinos, apresentaram entre os valores médios tanto de AST quanto BT diferenças estatísticas significativas nos diferentes dias testados, enquanto para GGT esse efeito dia não foi significativo. Porém, não houve efeito significativo em relação à interação entre dias e grupos, assim como também entre os valores médios nos diferentes grupos testados (controle, 20g/kg e 30g/kg) para os valores de AST, GGT e BT. Na comparação dos valores de AST entre os dias, observaram-se diferenças estatísticas, se aceito um nível de significância pouco acima de 6%, nos valores médios de AST dos dias 1 e 7 e também dos dias 3 e 7. As demais comparações entre as médias dos dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Nas comparações dos valores de BT entre os dias, podem ser considerados estatisticamente diferentes, para um nível de significância 5%, os valores médios de BT nos dias 0 e 1 e 0 e 7. As demais comparações entre as médias dos dias para AST e BT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A ocorrência de intoxicação por *Myoporum* sp ou outras por substâncias hepatotóxicas está na dependência de sua metabolização a metabólitos intermediários pelo fígado os quais são hepatotóxicos. A biotransformação destes tóxicos é feita através das MMFO hepáticas, as

quais ocorrem em maior concentração na zona centrolobular, em concentração intermediária na mediozonal e em menor concentração na região periportal (KELLY 1993).

Após vários estudos experimentais em camundongos, ratos, ovinos e bovinos sugerem-se que o mecanismo patogênico da toxicidade de *Myoporum*, bem como de outras plantas contendo óleos FST, esteja associado com o grau de atividade das MMFO hepáticas no momento da dosagem, outros fatores individuais do animal e com o estágio vegetativo da planta quando consumida.

Baseado neste estudo observou-se que os ovinos que consumiram 20g/kg e 30g/kg de folhas frescas de *M. laetum* em dose única, apresentaram associação entre os sinais clínicos, lesões hepáticas e a elevação dos níveis séricos de AST, GGT e BT; A avaliação bioquímica poderia representar um método mais sensível para detectar a intoxicação caso tivesse sido constatada alteração bioquímica antes dos sinais e alterações histológicas: caso tenha sido feito biopsia e dosagem enzimática ambos antes das 24hs, havendo somente alteração nas enzimas neste período; Embora os bovinos tenham consumido as mesmas doses de planta que os ovinos, apresentaram sinais clínicos e lesões histológicas mais discretas; A toxicidade da planta está, provavelmente, relacionada à época do ano que foi consumida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.G. & SEAWRIGHT, A.A. The effect of prior treatment with phenobarbitone, dicophane (DDT) and  $\beta$ -diethylaminoethylphenylpropyl acetate (SKF 525 A) on experimental intoxication of sheep with the plant *Myoporum deserti*. **Cunn. Res. Vet. Sci.** 15: 169-179, 1973.
- ALLEN, J.G.; SEAWRIGHT, A.A. & HRDLICKA, J. The toxicity of *Myoporum tetrandrum* (Boobialla) and myoporaceous furanoid essential oils for ruminants. **Aust. Vet. J.** 54: 287-292, 1978.
- ALLEN, J.G.; JAMES, L.F.; KEELER, R.F.; BAILEY, E.M.; CHEEKE, P.R.; HEGARTY, M. P. The effect of hepatic microsomal enzyme inducers and inhibitors on the toxicity of in the rat. **Poisonous plants. Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Symposium.** p. 245-250, 1992.
- BOGIN, E.; OTTO, F. & IBÁÑEZ, A. Patologia Clínica Veterinária. **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.** Asunción, Paraguay. 1989. 192 p.
- BRAGA, M. B.; CASTILHOS, L.M.L. & SANTOS, M.N. Biopsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. **Revta Centro Ciênc Rurais.** 15(1):79-88, 1985.
- CONNOR, H.E. The poisonous plants in New Zeland. Keating, Government Printer, Wellington, New Zealand. p. 128-131, 1977.
- DRIEMEIER, D.; BARROS, S.S.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. & BRITO, M.F. Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos ("foam cells"). **Pesq. Vet. Bras.** 29-34, 1998.
- FORD, E.J.H. & RIVERA, R. The modification of the dehydromyodesmone-induced hepatic lesion in cattle by microsomal drug metabolizing enzymes. **J. Comp. Path.** 88: 365-380, 1978.
- GONZÁLEZ, F.H.D. & SCHERER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In; Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais. **29<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária.** Gramado, Brasil. 15p. 2002.
- HRDLICKA, J.; SEAWRIGHT, A.A.; ALLEN, J.G. & HASTIE, J. The toxicity of Myomontanone, a lung-damaging furanosesquiterpene from *Myoporum montanum*, p. 465-462. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. (ed.) **Effects of Poisonous Plants on Livestock.** Academic Press, New York. 1978.
- HURST, E. Poison plants of New South Wales. **Poison plants Commitee.** New South Wales, Sydney, p. 383-391, 1942.
- JERRETT, I.V. & CHINNOCK, R.J. Outbreaks of photosensitisation and deaths in cattle due to *Myoporum aff insulare*. **R. Br. toxicity Aust. Vet. J.** 60: 183-186, 1983.
- KAWALEC, J.C.; EL-SAID, K.R. Maturational development of drug-metabolizing enzymes in sheep. **Am. J. Vet. Res.** 51(11): 1735-1741, 1990.
- KELLY, W. R. Liver and biliary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. & PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, 4<sup>a</sup> ed., Academic Press, Inc. California. v. 2, p. 382-388, 1993.

LAVEZZO, O.E.N.M.; LAVEZZO, W.; WECHSLER, F.S.; SARTORI, M.S.; ROCHA, G.P.; MEDINA, M.K.J & PADOVANI, N. Toxicidade hepática em ovinos, induzida pelo consumo de cama de frango em diferentes níveis. In: **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. (Fortaleza, Brasil). p. 205-207, 1996.

MARZELLA, L. & TRUMP, B.J. Pathology of the liver: functional and structural alterations of hepatocyte organelles induced by cell injury. In: Meeks R.G., Harrison S.D. & Bull R.J. (ed.) **Hepatotoxicology**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 93-138, 1991.

McCANN, P.J. Ngaio poisoning of cattle. **New Zealand Journal of Agriculture**, 72 (2): 139-140, 1946.

MÉNDEZ, M.C. Intoxicación por *Myoporum* spp. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. & SCHILD, A.L. **Intoxicaciones por plantas e micotóxicos em animais domésticos**. Editorial agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., Uruguai, p. 79-84, 1993.

MILANI, S.; HERBST, H.; SCHUPPAN, D.; NIEDOBITEK, G.; KIM, K.Y.; STEIN, H. Vimentin expression of newly formed rat bile duct epithelial cells in secondary biliary fibrosis. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, 415 (3), 237-242, 1989.

ODRIOZOLA, E.R.; TAPIA, M.O.; LÓPEZ, T.A.; CASARO, A.P. & CALANDRA, W. Intoxicación natural de bovinos con transparente (*Myoporum laetum* Forst.). **Rev. Med. Vet.**, Buenos Aires, 68 (4): 230-232, 1987.

RAGONESE A.E. Plantas Tóxicas para el Ganado. **Revta. Fac. Agronomia**, La Plata. 31(2):279-281, 1955.

RAPOSO, J.B.; MÉNDEZ, M.C., RIET-CORREA, F. & ANDRADE, G.B. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, Kansas USA, 40 (3): 132-135, 1998a.

RAPOSO, J.B.; MÉNDEZ, M.C.; ANDRADE, G.B. & RIET-CORREA, F. Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, Kansas USA, 40 (5): 275-273, 1998b.

RAPOSO, J.B.; RAFFI, M.B.; BAIALARDI, C.; ROSA, F. & BARROS, S.S. Observações histoquímica e ultra-estrutural no fígado de ovinos experimentalmente intoxicados por *Myoporum laetum*. **Anais II RAPAVE**, 27 a 29 de setembro de 2000, Corrientes, Argentina. p.75, 2000

ROWE, L.D. Photosensitization problems in livestock. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. 5 (2): 301-323, 1989.

SANTOS, M.M.A. Provas de Função e Lesão Hepática. Monitoria de Clínica Médica FM-UnB.[online]. 2003. 5p.

SEAWRIGHT, A.A. Patters of liver caused by ngaione in the rat. **Aust. Vet. J.** 44: 426, 1968.

SEAWRIGHT, A.A. & O'DONAHOO, M. Light- and electron-microscope observations of the liver of the mouse after a single oral dose of ngaione. **J. Path.** 106:251-259, 1973.

SEAWRIGHT, A.A.; LEE, J.S.; ALLEN, J.G. & HRDLICKA, J. Toxicity of *Myoporum* spp. and their furanosesquiterpenoid essential oils. In: KEELER, R.F.; VAN KAMPEN, K.R. & JAMES L.F. **Effects of Poisonous Plants on Livestock**. Academic Press, New York, p. 241-250, 1978.

## ANEXOS

FIGURA 1. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fotossensibilização hepática 3 dias após dosagem de 20g/kg da planta.

FIGURA 2. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fotossensibilização hepática 3 dias após dosagem de 30g/kg da planta.

FIGURA 3. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose centrolobular, 24 horas após dosagem de 20g/kg da planta.

FIGURA 4. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose centrolobular a periportal, 3 dias após dosagem de 20g/kg da planta.

FIGURA 5. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose periportal com hemorragia, 3 dias após dosagem de 20g/kg da planta.

FIGURA 6. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose periportal com discreta fibroplasia, 7 dias após dosagem de 20g/kg da planta.



Fig. 1. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fotossensibilização hepática 3 dias após dosagem de 20g/kg da planta.



Fig. 2. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fotossensibilização hepática 3 dias após dosagem de 30g/kg da planta.

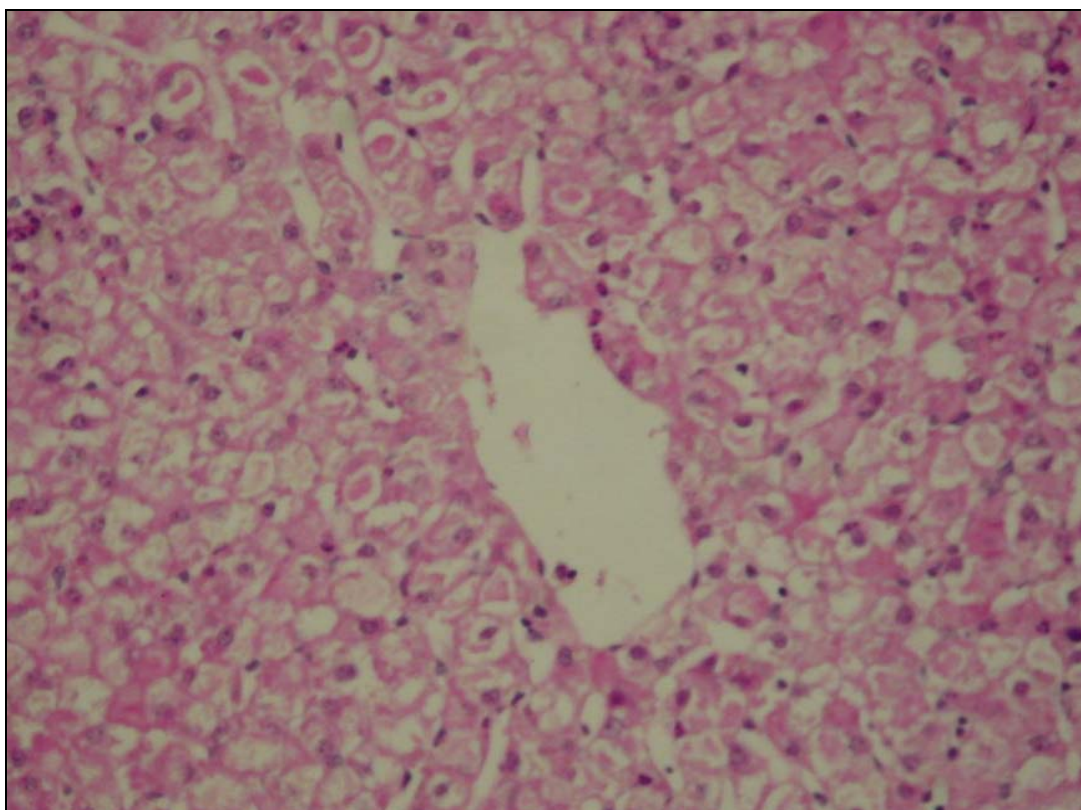


Fig. 3. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose centrolobular, 24 horas após dosagem de 20g/kg da planta.

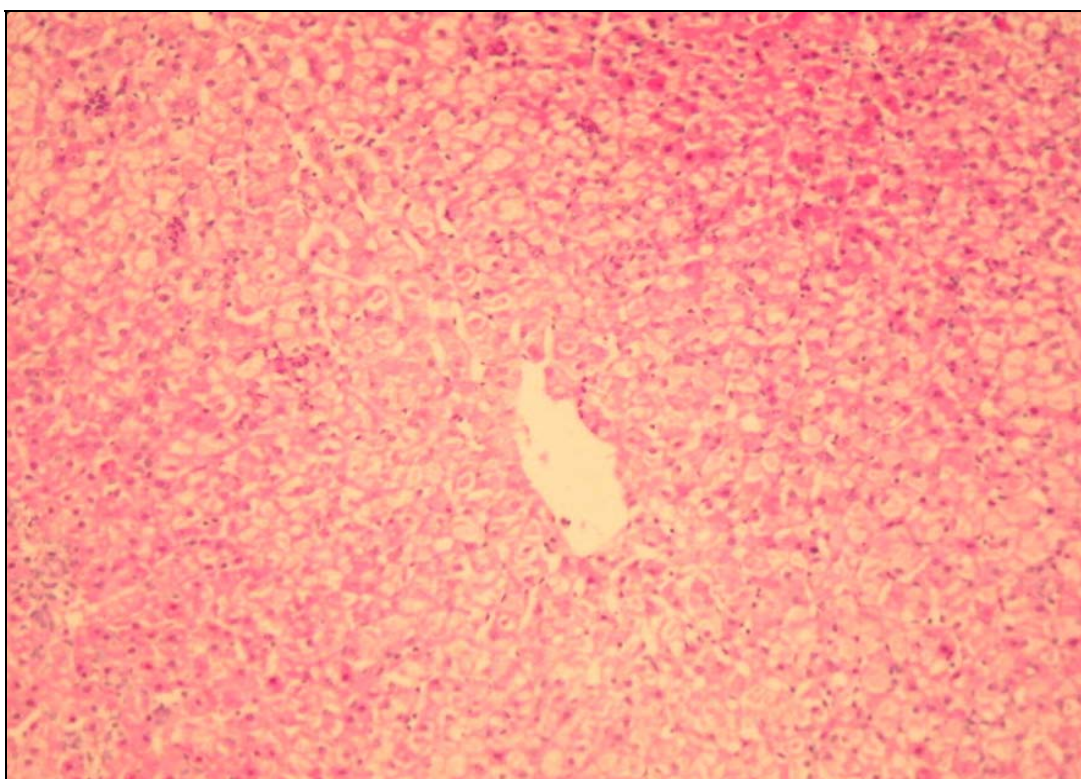


Fig. 4. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose centrolobular a periportal, 3 dias após dosagem de 20g/kg da planta.

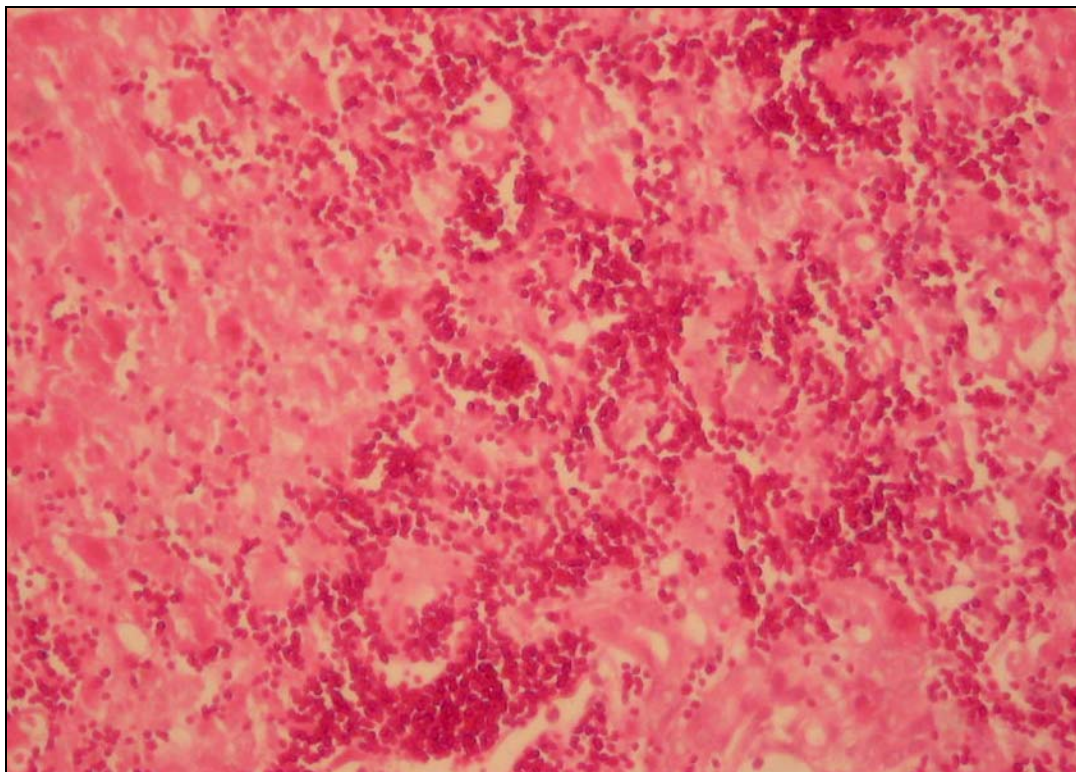


Fig. 5. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose periportal com hemorragia, 3 dias após dosagem de 20g/kg da planta.

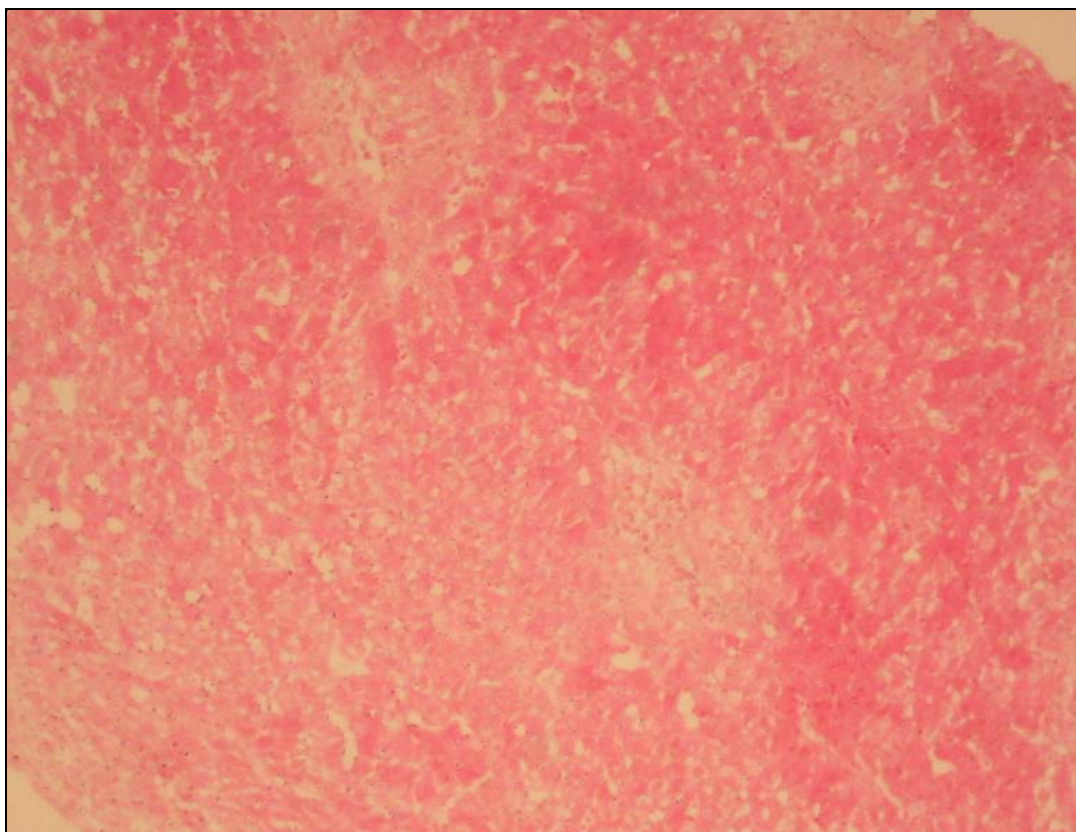


Fig. 6. Intoxicação *Myoporum laetum*. Ovino. Fígado. Necrose periportal com discreta fibroplasia, 7 dias após dosagem de 20g/kg da planta.