

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

**IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE LESÕES CARDÍACAS EM BOVINOS
INTOXICADOS POR *Amorimia exotropica***

Dissertação de Mestrado

Marcele Bettim Bandinelli

Porto Alegre
Fevereiro 2014

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

**IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE LESÕES CARDÍACAS EM BOVINOS
INTOXICADOS POR *Amorimia exotropica***

Autora: Marcele Bettim Bandinelli

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Porto Alegre
Fevereiro/2014

CIP - Catalogação na Publicação

Bettim Bandinelli, Marcele
Identificação e distribuição de lesões cardíacas em
bovinos intoxicados por Amorimia exotrópica. /
Marcele Bettim Bandinelli. -- 2014.
49 f.

Orientador : David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Amorimia exotrópica. 2. Intoxicação. 3. "Morte
súbita associada ao exercício". 4. Bovino. 5.
Troponina. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

MARCELE BETTIM BANDINELLI

IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE LESÕES CARDÍACAS EM BOVINOS
INTOXICADOS POR *Amorimia exotropa*

Aprovada em 17 de Fevereiro de 2014.

APROVADO POR

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Aldo Gava
Membro da Banca

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros
Membro da Banca

Prof. Dra. Luciana Sonne
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Terezinha e José pelo amor, dedicação, apoio, respeito, confiança e exemplos de integridade e caráter.

Às minhas irmãs Michele e Josiane pela amizade e companheirismo de toda vida.

Ao meu sobrinho Gustavo, fonte inesgotável de energia, bom humor, amor e alegria.

Ao meu namorado, marido, amigo, mestre, fonte de inspiração, dedicação e comprometimento Saulo Petinatti Pavarini.

Ao meu orientador Prof^o Dr. David Driemeier pela oportunidade, ensinamentos, convivência e exemplo de entusiasmo e dedicação profissional.

Aos queridos amigos que fiz no Setor de Patologia desta Universidade, bem como de outras instituições em que tive a oportunidade de dividir experiências e trocar conhecimentos. Em especial a Adriana Santos, Paulo Bandarra, Gabriel Frainer, André Dalto, Nádia Antoniassi, Gregory Juffo, Danilo Gomes, Fabiana Boabaid, Fabiana Wurster, Luciana Sonne, Suyene Souza, Gabriela Fredo, Mirna Porto, Flademir Wouters e Angélica Wouters.

Às queridas amigas Bárbara Krebs, Daniele Bassuño e Jacqueline Piccoli pelo auxílio na realização deste projeto.

As minhas amigas Luciana Torelly, Amanda Siviero, Raquel Michaelsen e Camila Damo pela compreensão, amizade e carinho incondicionais durante todos esses anos.

RESUMO

Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*

Amorimia exotropica é uma planta que pertence à família Malpighiaceae, cujo princípio tóxico é o monofluoracetato de sódio e possui ação cardiotóxica em bovinos. Ela é a única representante, na região Sul do país, do grupo de plantas que causam morte súbita associada ao exercício. Esta dissertação identificou e mapeou as lesões cardíacas observadas em bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. Selecionou-se nove corações bovinos, provenientes de um surto de intoxicação natural pela planta numa propriedade de gado de corte do Rio Grande do Sul e procedeu-se o mapeamento de oito regiões topográficas distintas (ápice, ventrículos direito e esquerdo, septo interventricular, músculos papilares direito e esquerdo e átrios direito e esquerdo). À avaliação macroscópica quatro bovinos apresentaram lesão focal e bem delimitada no músculo papilar esquerdo. Estas áreas na histologia correspondiam a infartos em diferentes estágios de evolução. Todos os bovinos apresentavam necrose de cardiomiócitos, caracterizadas por retração e hipereosinofilia citoplasmática e fragmentação celular em todas as áreas amostradas. A severidade da injúria celular foi avaliada pela imuno-histoquímica anti-Troponina C, a qual demonstrou nestes cardiomiócitos acentuada perda e/ou diminuição de marcação citoplasmática em células necróticas. O músculo papilar esquerdo foi a região mais acometida nos casos de intoxicação por *Amorimia exotropica*.

Palavras chaves: *Amorimia exotropica*, intoxicação, morte súbita associada ao exercício, bovino, lesão cardíaca, imuno-histoquímica, troponina.

ABSTRACT

Identification and distribution of cardiac lesions in cattle poisoned by *Amorimia exotropica*

Amorimia exotropica is a Malpighiaceae family plant that has sodium monofluoroacetate as the toxic principle, which has a cardiotoxic action in cattle. In Southern Brazil, it is the only present species of the group of plants that causes "sudden death during exercise". This dissertation has identified and mapped cardiac lesions observed in cattle naturally poisoned by *Amorimia exotropica*. A poisoning outbreak by the plant occurred in a beef cattle herd from Rio Grande do Sul, where nine bovine hearts were selected for examination and mapping of eight distinct topographical regions (apex, right and left ventricles, interventricular septum, right and left papillary muscles, right and left atrium). At gross examination, four cattle showed focal and well-defined lesions in the left papillary muscle. This corresponded to areas of infarcts in different stages of evolution on histology. All hearts showed cardiomyocyte necrosis, characterized by shrinkage and hypereosinophilic cytoplasm and cellular fragmentation in all sampled areas. The severity of cellular injury was evaluated by immunohistochemistry anti-Troponin C, which showed marked decrease of cytoplasm staining in necrotic cells. Left papillary muscle was the most affected region in cases of poisoning by *Amorimia exotropica*.

Key words: *Amorimia exotropica*, poisoning, sudden death association with exercise, cattle, cardiac lesion, immunohistochemistry, troponin.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Anatomia, histologia e metabolismo energético da musculatura cardíaca	14
2.2 Mecanismo contrátil cardíaco e uso de subunidades do complexo troponina na imuno-histoquímica	15
2.3 Aspectos gerais da intoxicação por plantas que causam morte súbita associada ao exercício (MSAE)	17
2.4 Monofluoroacetato de sódio	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO I	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição qualitativa das lesões histológicas de acordo com a região topográfica cardíaca em bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. 35
- Tabela 2.** Distribuição quantitativa do número total de cardiomiócitos necróticos a partir da topografia cardíaca dos nove bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. 37
- Tabela 3.** Tabela de estatísticas descritivas a partir da topografia cardíaca dos nove bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. 38
- Tabela 4.** Tabela ANOVA para avaliação de diferença estatística inter e intra-grupos. 38
- Tabela 5.** Tabela de grupos homogêneos em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia externa de *Amorimia exotropica*. **A.** Área de mata com abundante quantidade de plantas rasteiras emitindo cipós em direção a copa das árvores. **B.** Aspecto de ramos rasteiros de *A. exotropica* em ambiente sombreado. **C.** Brotação com folhas reticuladas (nervura reticulínea), pontas afiladas, limbo liso, brilhante e glabro. **D.** Sistema radicular pivotante bem desenvolvido com formação de pequenas nodulações em um broto. **E.** Aspecto da floração de *Amorimia exotropica*. **F.** Aspecto dos frutos (sâmaras) maduros de *Amorimia exotropica* de coloração acastanhada, fundamentais para a anemocoria. 20

Figura 2. Aspectos gerais da propriedade. **A.** Local onde os bovinos estavam no momento em que foram movimentados para serem transportados para o frigorífico. **B e C.** Carcaça de bovinos no piquete de campo nativo com área de mata ao fundo, onde havia grande quantidade de *Amorimia exotropica*. **D.** Propriedade de campo nativo com área sombreada de mata ao fundo, sem proteção para evitar que os animais se abrigassem no local. **E.** Mesmo local da foto anterior, evidenciando a presença de fezes e de *Amorimia exotropica* em grande quantidade. **F.** Ausência de folhas nos cipós, evidenciando o consumo no local. 25

Figura 3. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. **A.** Aspecto macroscópico do coração de um bovino adulto, sem alterações. **B.** As quatro linhas tracejadas, representam os locais das secções completas transversais, equidistantes, realizadas para inspeção visual. **C.** Aspecto final do coração seccionado, desde o ápice até a base. **D e E.** Representação esquemática das áreas coletadas para avaliação histológica e imuno-histoquímica. No detalhe tracejado, fragmento do ápice (AP) cardíaco amostrado. MPE: músculo papilar esquerdo, MPD: músculo papilar direito, SIV: septo interventricular, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo. 27

Figura 4. Aspecto macroscópico das lesões na musculatura papilar esquerda de quatro bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. **A.** Área focal, avermelhada entremeada por áreas brancacentas, bem delimitada, arredondada, de 3 cm de diâmetro (Bovino 2) **B.** Área focal, avermelhada, pouco delimitada, de 1,5 cm de diâmetro (Bovino 8) **C.** Lesão focal, bem delimitada, levemente avermelhada com pequena área focal central discretamente mais pálida, de 1,5 cm de diâmetro (Bovino 5). **D.** No detalhe, área focal discretamente pálida (Bovino 7). 28

Figura 5. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. **A, C e E.** Áreas multifocais a coalescentes de hipereosinofilia, retração e aspecto homogêneo citoplasmático de cardiomiócitos. HE, 100x, 200x e 400x, respectivamente. **B, D e F.**

Ausência de marcação citoplasmática em cardiomiócitos que apresentavam lesões de hipereosinofilia, IHQ anti-Troponina C, 100x, 200x e 400x. 31

Figura 6. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. A e C. Área focalmente extensa de necrose de coagulação, com fragmentação dos cardiomiócitos além de fibroplasia discreta e influxo de macrófagos. HE, (200x e 400x, respectivamente). E. Proliferação de tecido conjuntivo no miocárdio evidenciada pela coloração de Tricrômio de Masson, 400x. B, D e F. Ausência e diminuição de intensidade de marcação citoplasmática em cardiomiócitos em áreas correspondentes. IHQ anti-Troponina C, (200x, 400x e 400x)..... 32

Figura 7. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *A. exotropica*. Músculo papilar esquerdo, Bovinos 2 e 8. A. Imagem submacroscópica que evidencia área central hipereosinofílica e bem delimitada (infarto), HE. B. Área idêntica a anterior demonstrando perda de marcação na IHQ anti-Troponina C em área de infarto. C. Área de transição do infarto, com três regiões distintas: cardiomiócitos sem alteração (asterisco), área marginal de infiltrado inflamatório e necrose de coagulação, HE, 100x. D. Mesma área da Fig. C contrastando a intensa marcação imuno-histoquímica na área sem lesão (asterisco) e a perda total na área de infarto, IHQ anti-Troponina C, 100x. E. Área focalmente extensa de discreta fibroplasia na margem do infarto, TM, 200x. F. Área central do infarto com acentuada ausência de marcação e presença em região periférica, IHQ anti-Troponina C, 200x..... 33

Figura 8. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. Músculo papilar esquerdo, Bovinos 5 e 7. A, C e E. Áreas de infarto em fase de reparação, na qual há moderada fibroplasia e infiltrado macrofágico e linfocitário, entremeada por cardiomiócitos hipereosinofílicos e fragmentados, HE, 200x e TM, 200x e 400x respectivamente. B, D e F. Acentuada perda e diminuição da marcação citoplasmática em cardiomiócitos em áreas de infarto em fase de reparação, IHQ anti-Troponina C, 200x, 200x e 400x respectivamente. 200x..... 34

Figura 9. Gráfico esquemático da distribuição quantitativa da severidade das lesões, a partir das áreas topográficas do coração de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito; SIV: septo interventricular; MPE: músculo papilar esquerdo; MPD: músculo papilar direito;..... 36

Figura 10. Representação gráfica da frequência percentual de lesões em cardiomiócitos dos bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito; SIV: septo interventricular; MPE: músculo papilar esquerdo; MPD: músculo papilar direito..... 37

Figura 11. Gráfico de distribuição da contagem média de células mortas para cada área topográfica analisada de todos os bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. 39

Figura 12. Avaliação histológica e imuno-histoquímico em cortes seriados de corações de bovinos controles. Coração. A e C. Cardiomiócitos sem alteração, HE, 40x e 200x.. **B e D.** Intensa marcação citoplasmática em cardiomiócitos sem alteração, IHQ anti-Troponina C, 40x e 200x..... 39

1. INTRODUÇÃO

No Brasil há cerca de 131 espécies de plantas tóxicas distribuídas em 79 gêneros, e estas são responsabilizadas pelas mortes de 820 mil a 1.775.763 bovinos/ano de um plantel nacional de 221.827.299 (PESSOA *et al.*, 2013). No estado do Rio Grande do Sul, estas perdas variam de 7,4% a 14% com prejuízos em torno de US\$ 15 milhões ao ano (RIET-CORREIA; MEDEIROS, 2001; PEDROSO *et al.*, 2007; RISSI *et al.*, 2007; PESSOA *et al.*, 2013).

As plantas tóxicas são didaticamente divididas de acordo com os sistemas orgânicos nos quais elas provocam alterações. Dentre as principais plantas que afetam o funcionamento cardíaco estão as causadoras de morte súbita associadas ao exercício. Elas provocam lesões agudas ou superagudas, com insuficiência cardíaca e morte súbita em bovinos e pertencem às famílias Malpighiaceae, Rubiaceae e Bignoniaceae. Dentre as mortes por intoxicações por plantas no Brasil, estima-se que 50% delas decorram da ingestão de plantas que causem morte súbita em bovinos (PESSOA *et al.*, 2013).

Amorimia (Mascagnia) exotropa, pertence à família Malpighiaceae, é um semi-arbusto encontrado nos estados do Sul do Brasil e na Argentina (ANDERSON, 2006). Não possui nome popular, ocorre em locais sombreados como beiras de matas e sua toxicidade para a espécie bovina foi descrita pela primeira vez e comprovada experimentalmente por Gava *et al.* (1998). Caracteristicamente, o consumo desta planta acarreta “morte súbita associada ao exercício”, pois apresenta como princípio tóxico o monofluoracetato de sódio (LEE, 2012). Quando esses animais desenvolvem sinais clínicos perceptíveis, eles têm duração de poucos minutos e incluem: taquicardia, ingurgitação da veia jugular, tremores e contrações musculares bruscas, quedas súbitas, decúbito lateral, esternal e morte (GAVA *et al.*, 1998, PAVARINI *et al.*, 2011).

Esta dissertação tem por objetivo descrever e determinar a distribuição das lesões cardíacas observadas em bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropa*, por meio da avaliação macroscópica, histológica e imuno-histoquímica anti-troponina C.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia, histologia e metabolismo energético da musculatura cardíaca

O coração localiza-se no lado esquerdo do plano mediano do tórax e corresponde a 0,4 – 0,5 % do peso corporal de um bovino adulto. Ele é totalmente envolvido pelo saco pericárdico, o qual contém uma pequena quantidade de fluido seroso que confere lubrificação a superfície epicárdica (pericárdio seroso visceral) e o pericárdio seroso parietal durante os batimentos cardíacos. Na base cardíaca estão localizados os grandes vasos; e o ápice dista cerca de 2,5 cm do diafragma, em grandes ruminantes (GETTY, 1986).

Histologicamente, as células musculares cardíacas (cardiomiócitos) possuem núcleos centrais, estriações transversais evidentes, formam fibras miocárdicas de tamanhos variados e faixas transversais que se coram densamente na coloração de rotina (os discos intercalares). Grupos paralelos de fibras são separados por feixes revestidos por bainhas de tecido conjuntivo e esses feixes formam camadas de fibras musculares com orientações diferentes conforme se diseca o miocárdio (ROSS; PAWLINA, 2008).

Em cada cardiomiócito há miofibrilas agrupadas em um arranjo linear que formam grupos paralelos, enovelados e repetidos; cada miofibrila estende a célula até seu comprimento máximo e se insere na superfície citoplasmática do disco intercalar. Os discos intercalares são junções membranosas pareadas especializadas que conectam as extremidades em série, e na microscopia óptica seu componente transversal (fáscia de aderência) que cruza as fibras em ângulo reto, pode ser observado. Eles apresentam ainda desmossomas, que reforçam a fáscia de aderência e as junções comunicantes (*gap junctions*), responsáveis pela continuidade tônica entre as células musculares, pois permitem que as fibras musculares se comportem como um sincício, conservando ao mesmo tempo a integridade celular e a individualidade (ROSS; PAWLINA, 2008).

As organelas citoplasmáticas localizam-se nos cardiomiócitos ao redor do núcleo, onde as miofibrilas separam-se numa região denominada citoplasma justanuclear. Esta região é rica em mitocôndrias, complexos de Golgi, grânulos de lipofuscina e glicogênio. Nos átrios, nesta região, há ainda dois hormônios polipeptídicos – fator natriurético atrial e fator natriurético cerebral, armazenados sob

forma de grânulos que controlam a excreção urinária de sódio (GUYTON; HALL, 2002; ROSS; PAWLINA, 2008).

Em relação às mitocôndrias, além das localizadas no citoplasma justanuclear, grandes mitocôndrias se distribuem entre as miofibrilas por toda a extensão do sarcômero, assim a liberação e recaptção de energia ocorre adjacente as miofibrilas que utilizam esta energia para impulsionar a contração. Entre as miofibrilas são encontradas, frequentemente, gotículas de lipídios e grânulos de glicogênio, os quais estão distribuídos de forma uniforme e dispersa (GUYTON; HALL, 2002; ROSS; PAWLINA, 2008).

Sob circunstâncias normais, as células miocárdicas utilizam a via aeróbia para obtenção de energia. O principal substrato utilizado pelo metabolismo cardíaco são os ácidos graxos livres, seguidos pela glicose e o lactato. Aminoácidos, cetonas e o piruvato contribuem em menor escala (VOET *et al.*, 2000).

2.2 Mecanismo contrátil cardíaco e uso de subunidades do complexo troponina na imuno-histoquímica

O sarcômero é a unidade contrátil fundamental do tecido muscular e é composto por miofilamentos, que são proteínas contráteis formadas, fundamentalmente, por miosina, actina, tropomiosina e troponina. Eles apresentam bandas transversais escuras, denominadas linhas Z as quais formam os limites de cada sarcômero. Há ainda zonas claras (banda I) e escuras (banda A) localizadas dentro da unidade devido ao arranjo da actina e miosina (GUYTON; HALL, 2002; ROSS; PAWLINA, 2008).

Durante a contração o sarcômero e a banda I se encurtam, enquanto a banda A permanece do mesmo comprimento. Cada ciclo de contração envolve: a fixação da porção globular (cabeça) da miosina às moléculas de actina - filamento fino e a liberação desta fixação devido à ligação da adenosina trifosfato (ATP) à cabeça miosínica, a qual, por sua vez, induz alterações na conformação do sítio de ligação da actina. Esta alteração reduz a afinidade da cabeça da miosina pelo filamento fino da actina e promove uma inclinação nessa porção da miosina. A hidrólise do ATP em adenosina trifosfato (ADP) + fosfato inorgânico (Pi) é que inicia este processo de inclinação da cabeça da miosina e promove o aumento da afinidade da ligação entre a cabeça miosínica e seu novo local de fixação - uma molécula de actina “vizinha”. Com a liberação de Pi há a produção de força, ou seja, a miosina tenta perder essa inclinação

e força o deslizamento do filamento de actina fino sobre o grosso, nesse momento há perda do ADP na cabeça da miosina. A refixação é o último estágio da contração muscular e ocorre pela forte ligação da miosina ao “novo” sítio da actina, voltando à conformação rígida e permitindo que o ciclo possa se repetir (GUYTON; HALL, 2002; ROSS; PAWLINA, 2008).

O cálcio é fundamental para que todo esse processo descrito ocorra. Os sistemas que regulam o aporte e a remoção do cálcio são o sistema tubular transverso ou em T e o retículo sarcoplasmático. O retículo sarcoplasmático se dispõe em rede, em torno das miofibrilas, em região justanuclear. No ponto em que duas redes se encontram, o retículo forma um canal anular designado de cisterna terminal. Estas cisternas servem de reservatório para o Ca^{2+} . O sistema T consiste em numerosas invaginações tubulares da membrana plasmática (sarcolema) que penetram em todos os níveis da fibra muscular e estão localizados em cisternas entre as bandas A-I. A despolarização da membrana do túbulo T desencadeia a liberação de Ca^{2+} pelas cisternas terminais para dar início à contração muscular. Esse aumento na concentração de íons cálcio no sarcoplasma liga-se a subunidade C da troponina (TnC), permitindo que a subunidade I da troponina (TnI) se dissocie das moléculas de actina para que a miosina possa se ligar nesses pontos. Simultaneamente, uma bomba ATPase ativada por Ca^{2+} na membrana do retículo sarcoplasmático transporta Ca^{2+} de volta para as cisternas terminais (ROSS; PAWLINA, 2008).

É a hidrólise de ATP em ADP + Pi que fornece energia necessária para que ocorra o movimento de ligação actina-miosina e a contração muscular. Se houver falta de ATP para hidrólise não há o relaxamento e a ligação actina-miosina permanece (ROSS; PAWLINA, 2008). Isso ocorre porque na presença de ATP a ligação da miosina com a actina é fraca. O *rigor mortis*, exemplifica a ausência de ATP e a, conseqüente, rigidez cadavérica.

A tropomiosina é uma proteína de 64 kD, que consiste em uma hélice dupla e dois polipeptídeos. Ela forma filamentos que passam pelo sulco entre as moléculas de actina e no músculo em repouso ela e seu complexo troponina (proteína reguladora) mascaram o local de ligação da miosina na molécula de actina (ROSS; PAWLINA, 2008).

O complexo troponina apresenta três subunidades globulares e para cada tropomiosina há um complexo de troponina. A Troponina C (TnC) é a menor

subunidade desse complexo, possui 18kD e liga-se ao Ca^{2+} , promovendo uma modificação na conformação da tropomiosina, a qual libera seu sítio para que ocorra a ligação da porção globular (cabeça) da miosina à actina. A Troponina T (TnT), possui 30kD e se liga a tropomiosina diretamente, ancorando todo o complexo da troponina. A Troponina I (TnI), também possui 30kD e liga-se a actina inibindo a interação actina-miosina. Desta maneira possui ação inibitória em relação a contração muscular (ROSS; PAWLINA, 2008). As isoformas TnT e TnI apresentam especificidade pela musculatura cardíaca e sua elevação na circulação sanguínea é indicativa de lesão em cardiomiócitos (GUNES et al., 2005). A atividade sérica da TnI tornou-se padrão-ouro em medicina, para avaliação de infarto agudo do miocárdio, uma vez que ela é liberada no sangue dentro de três – 12 horas após a injúria cardíaca e seus níveis permanecem elevados por até duas semanas. O grau de lesão celular é diretamente proporcional à quantidade da isoforma circulante (JEREMIAS; GIBSON, 2005; MAHAJAN *et al.*, 2006; LAZERRI, 2008; NEUWALD *et al.*, 2013). Em veterinária, tal uso como marcador bioquímico sérico foi demonstrado em diversas espécies como em cães e gatos (RISHNIW *et al.*, 2004; ADIN *et al.*, 2006; BURGNER *et al.*, 2006; FONFARA *et al.*, 2010), suínos (FENG *et al.*, 1998), ovinos (NEUWALD *et al.*, 2013) e bovinos (GUNES *et al.*, 2005; MELLANBY *et al.*, 2007).

O uso das troponinas na imuno-histoquímica como ferramenta auxiliar diagnóstica na detecção de lesão cardíaca na espécie bovina foi demonstrada apenas por Pavarini *et al.* (2012) com Troponina C e Tunca *et al.* (2008) com Troponina I, em casos de intoxicação por *A. exotropa* e febre aftosa, respectivamente.

2.3 Aspectos gerais da intoxicação por plantas que causam morte súbita associada ao exercício (MSAE)

No Brasil, segundo dados de Pessoa et al. (2013), são 131 espécies e 79 gêneros. No país a população de bovinos chega a quase 222 bilhões (IBGE 2012) e estima-se que as plantas que causem morte súbita associada ao exercício (MSAE) sejam responsáveis pela morte de 50% de todos os animais que morrem em decorrência de intoxicações por plantas (PESSOA *et al.*, 2013).

Dentre as plantas causadoras de MSAE, devido à sua ação cardiotóxica, há 13 espécies distribuídas em três famílias: Rubiaceae (*Palicourea marcgravii*, *P. aeneofusca*,

P. juruana, *P. grandiflora*), Malpighiaceae (*Amorimia exotropica*, *A. pubiflora*, *A. aff. Rígida*, *A. septentrionalis*, *A. sepium*, *A. amazônica*) (LEE et al., 2012) e Bignoniaceae (*Tanaecium bilabiatum* (*Arrabidaea bilabiata*), *Fridericia* (*Arrabidaea*) *japurensis* e *Pseudocalymma elegans*) (ANDERSON, 2006; LEE et al., 2012; TOKARNIA et al., 2012; DUARTE et al., 2013).

Palicourea marcgravii é a principal planta do grupo MSAE, uma vez que possui ampla distribuição no território nacional, exceto na região Sul do Brasil, no semi-árido do Nordeste e Mato Grosso do Sul. Na região Sul a única planta pertencente ao grupo MSAE é a *Amorimia exotropica* (GAVA et al., 1998; PAVARINI et al., 2011; DUARTE et al., 2013; PESSOA et al., 2013).

A flora brasileira da família Malpighiaceae conta com 528 espécies distribuídas em 44 gêneros, sendo que na região Sul existem 20 gêneros: *Alicia*, *Amorimia*, *Aspicarpa*, *Banisteriopsis*, *Bronwenia*, *Bunchosia*, *Byrsonima*, *Callaeum*, *Dicella*, *Diplopterys*, *Heteropterys*, *Hiraea*, *Janusia*, *Mascagnia*, *Niedenzuella*, *Stigmaphyllon*, *Tetrapteryx* e *Thryallis*) e cerca de 64 espécies (MAMEDE et al., 2010).

No Brasil sete espécies de *Amorimia* spp. são descritas, das quais cinco são comprovadamente tóxicas (*A. rigida*, *A. septentrionalis*, *A. pubiflora*, *A. exotropica* e *A. amazonica*) (TOKARNIA et al., 1961; TOKARNIA; DOBEREINER, 1973; GAVA et al., 1998; LEE et al., 2012; DUARTE et al., 2013), enquanto a *Amorimia maritima* e *Amorimia velutina* não foram relatadas como tóxicas até o momento (LEE et al., 2012, DUARTE et al., 2013).

Amorimia exotropica é um semi-arbusto, cujos caules são finos e os frutos (sâmaras) são alados lateralmente, encontrada nos estados do Sul do Brasil e na Província de Misiones na Argentina. Não possui nome popular e ocorre em locais sombreados como beiras de matas e encostas de morro. A planta germina no solo, possui sistema radicular bem desenvolvido e emite ramos em forma de lianas, ou seja, que necessitam de um suporte para manterem-se eretas e crescerem em direção à radiação solar (ANDERSON, 2006). Por essa razão são encontradas entremeadas a arbustos e árvores em áreas de mata e no solo desses locais (**Figura 1**). Sua toxicidade para a espécie bovina foi descrita pela primeira vez e comprovada experimentalmente por Gava et al. (1998), com dose tóxica única letal de 7,5-10g/Kg de planta fresca. Após se tornar reconhecidamente tóxica nos estados do Sul do Brasil, inúmeras mortes de bovinos ao longo dos anos foram observadas devido à ingestão de *Amorimia exotropica*

(PAVARINI *et al.*, 2011). A intoxicação pela planta mata os animais sem sinais clínicos prévios em situações rotineiras, como troca de piquetes, manejo em mangueiras, etc. Uma vez movimentados, esses animais podem apresentar ataxia, tremores e contrações musculares bruscas, taquicardia, taquipneia, decúbito, movimentos de pedalagem e morte num período inferior a 10 minutos (TOKARNIA *et al.*, 2012; PAVARINI *et al.*, 2011).

Recentemente a presença de monofluoracetato de sódio foi comprovada por Lee (2012) em espécies de *Amorimia*. Este princípio tóxico é o mesmo identificado nas demais plantas do grupo MSAE e a lesão histológica renal característica - degeneração hidrópico-vacuolar do epitélio dos túbulos contorcidos distais, observada em parte dos bovinos intoxicados pelas plantas deste grupo, são idênticas às reproduzidas na intoxicação experimental direta com o monofluoracetato (NOGUEIRA *et al.*, 2010).

Macroscopicamente, geralmente não são observadas lesões morfológicas nos animais intoxicados, contudo lesões inespecíficas como mucosa oral discretamente cianótica, hidropericárdio leve a moderado, petéquias e sufusões epicárdicas, edema pulmonar, coloração avermelhada de mucosas do abomaso e intestino delgado, além de leve acentuação do padrão lobular hepático foram descritas por Pavarini *et al.* (2011) e Gava *et al.* (1998) em casos de intoxicação na espécie bovina.

Pavarini *et al.* (2012) observou no coração dos bovinos intoxicados por *A. exotropica* necrose de coagulação de cardiomiócitos isolados ou em grupos com ausência de marcação imuno-histoquímica nestas áreas para Troponina C, confirmando a perda desta proteína nestes locais. Gava *et al.* (1998) descreveram aumento da eosinofilia das fibras cardíacas. Soares (2011b) relacionou à ingestão crônica da planta, fibrose cardíaca, em bovinos da região nordeste do Rio Grande do Sul. Tal lesão foi reproduzida experimentalmente em coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus Cuniculus*) ao administrar-se a dose tóxica 18g.Kg^{-1} fracionada em $3,6\text{g.Kg}^{-1}$ em intervalos de quatro dias, chegando ao dobro da dose tóxica para a espécie. Na avaliação ultraestrutural do coração desses coelhos, por meio de microscopia eletrônica, observou-se severa tumefação de cardiomiócitos com ruptura miofibrilar, além de tumefação, desorganização, atrofia e ruptura de cristas mitocondriais. Esse padrão de lesão era desuniforme, uma vez que algumas células apresentavam graves alterações e outras, praticamente, normais. (SOARES *et al.*, 2011b). Soares *et al.* (2011a) também

demonstrou o padrão de lesão ultraestrutural mitocondrial em dois coelhos que receberam uma única dose de 18g.Kg⁻¹.



Figura 1. Morfologia externa de *Amorimia exotropa*. **A.** Área de mata com abundante quantidade de plantas rasteiras emitindo cipós em direção a copa das árvores. **B.** Aspecto de ramos rasteiros de *A. exotropa* em ambiente sombreado. **C.** Brotação com folhas reticuladas (nervura reticulínea), pontas afiladas, limbo liso, brilhante e glabro. **D.** Sistema radicular pivotante bem desenvolvido com formação de pequenas nodulações em um broto. **E.** Aspecto da floração de *Amorimia exotropa*. **F.** Aspecto dos frutos (sâmaras) maduros de *Amorimia exotropa* de coloração acastanhada, fundamentais para a anemocoria.

2.4 Monofluoroacetato de sódio

O monofluoroacetato de sódio (MS) é conhecido popularmente como “mão branca” ou composto 1080, altamente tóxico para mamíferos. Seus efeitos tóxicos são muito variáveis em função da espécie intoxicada e da sensibilidade individual (PROUDFOOT *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Na segunda guerra mundial devido à falta de rodenticidas como tálio e estricnina, o MS ganhou destaque e ficou popularmente conhecido como 1080, número dado pelo Centro de Pesquisa de Animais Selvagens dos Estados Unidos da América (PROUDFOOT *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2011). Nos anos pós-guerra teve seu uso amplamente difundido como potente rodenticida em vários países do mundo. A partir de 1982 sua fabricação, comercialização e uso foram proibidos no Brasil. Atualmente, nos EUA e em diversos outros países sua fabricação e comercialização também são proibidas (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Quimicamente trata-se de um composto cristalino, insípido, solúvel em água, de coloração branca e bastante estável (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Intoxicações acidentais agudas por MS em medicina são incomuns (PROUDOFF *et al.*, 2006), contudo em veterinária ocorrem com bastante frequência e uma grande quantidade de plantas com distribuição mundial possuem o MS como seu princípio tóxico e são responsabilizadas por mortes de animais de fazenda. Como exemplos, podemos relacionar: *Dichapetalum cymosum* - nativa da África do Sul, (KELLERMAN *et al.*, 2005); *Acacia georginae*, *Oxylobium parviflorum* e *Gastrolobium grandiflorum* (Austrália) (ALPIN *et al.*, 1983) e no Brasil *Palicourea marcgravii* (OLIVEIRA *et al.*, 1963), *Tanaecium bilabiatum* (*Arrabidaea bilabiata*) (KREBS *et al.*, 1994) e todas as espécies de *Amorimia* spp (LEE *et al.*, 2012). No Brasil essas plantas foram classificadas como pertencentes ao grupo “morte súbita (Tokarnia e Döbereiner, 1982), e atualmente integram o grupo das plantas que causam morte súbita associada ao exercício (DUARTE *et al.*, 2013; PESSOA *et al.*, 2013)

O mecanismo de ação da substância interfere no ciclo do ácido cítrico (Krebs), considerado o centro do metabolismo celular. Tal ciclo é uma rota central para a recuperação de energia a partir de vários combustíveis metabólicos, incluindo os carboidratos, os ácidos graxos e os aminoácidos, os quais são convertidos em acetil-CoA para oxidação. Cada vez que esse importante ciclo que envolve oito reações oxida

o acetil-CoA, ocorre a formação de duas moléculas de CO_2 , três moléculas de NADH, uma de FADH_2 e um composto de “alta energia” ATP (VOET *et al.*, 2000).

A toxicocinética do MS baseia-se na formação de seu metabólito ativo (fluorocitrato). Uma vez ingerido o MS é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e distribuído pelos tecidos, contudo o quadro clínico varia conforme a espécie, mas fundamentalmente, os sinais clínicos são neurológicos e cardiovasculares (PROUDFOOT *et al.*, 2006). O monofluoracetato de sódio combina-se com a coenzima A, formando o composto fluoroacetil-CoA, o qual pode substituir o Acetil-CoA no ciclo de Krebs ou reagir com a enzima citrato sintase (que em condições normais catalisaria a condensação da acetil-CoA com oxaloacetato), produzindo fluorocitrato (PROUDFOOT *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2010). Os isômeros, por sua vez, do fluorocitrato irão inibir a aconitase e interromper o ciclo de Krebs, acarretando na não formação de isocitrato e no acúmulo de citrato (PROUDFOOT *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2010).

A interrupção do ciclo de Krebs provoca uma série de alterações no metabolismo energético celular, já que não há formação de NADH e FADH_2 por essa via, o que impede a transferência de elétrons para a cadeia respiratória e a, conseqüente, formação de ATP, comprometendo todo funcionamento celular, em especial, de células com alta demanda energética, como os cardiomiócitos (VOET *et al.*, 2000; PEIXOTO, 2010). Em conseqüência desta interrupção, ocorre aumento nos níveis de ceto-substâncias no sangue, uma vez que há aumento da síntese hepática de acetoacetato e inibição de sua utilização nos tecidos (PROUDFOOT *et al.*, 2006). Há marcada redução na utilização de piruvato e da incorporação de CO_2 nos ácidos orgânicos. O acúmulo de ácido láctico, devido ao metabolismo anaeróbio, provoca diminuição do pH sanguíneo e agrava o quadro de acidose láctica (NOVÁK; MISUSTOVÁ; HOSEK, 1972). O acúmulo de citrato nos tecidos leva a inibição secundária da enzima fosfofrutoquinase (GODOY; CARMEN, 1974), com subsequente inibição da glicólise, o que também resulta na redução da produção e oferta de energia, falha da respiração celular seguida de morte celular. Além de interferir na glicólise, o aumento de citrato promove hipocalcemia, devido ao seu efeito quelante (PROUDFOOT *et al.*, 2006). O bloqueio do ciclo de Krebs impede a formação de α -cetogluturato (precursor do glutamato), isso promove a diminuição da síntese de glutamina, neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e com importante papel no ciclo da uréia. Assim há acúmulo de amônia

circulante em decorrência da intoxicação por MS (PROUDFOOT *et al.*, 2006; PEIXOTO, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Inicialmente os animais intoxicados pelo MS foram distribuídos em quatro categorias distintas de acordo com os sinais clínicos que apresentavam, nas quais o Grupo I compreendia animais cujos efeitos eram predominantes sobre o coração; Grupo II efeitos tanto no coração, quanto no sistema nervoso central (SNC); Grupo III efeitos predominantes sobre o SNC e Grupo IV animais com sintomatologia atípica, na qual os ratos e hamsters eram os representantes. Contudo a espécie bovina e ovina não haviam sido classificadas na ocasião, dessa maneira Nogueira *et al.* (2011) propuseram modificações nesta classificação e sugeriu que bovinos e ovinos fossem colocados no Grupo I, juntamente, com coelhos e equinos, uma vez que as principais alterações observadas nessas espécies ocorrem no coração. Desde então os bovinos integram o Grupo I dessa classificação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Selecionaram-se nove corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*, a partir de um surto ocorrido no mês de junho de 2012 em uma propriedade rural no estado do Rio Grande do Sul (Bovinos 1 a 9). A propriedade é localizada em São Francisco de Paula, possui 126 hectares e havia recebido 23 bovinos (animais adultos de raças variadas: Angus, Devon e Nelore) que estavam em sistema de confinamento em outra propriedade, cujo principal componente da dieta era batata inglesa (restos de cultura). Nesta propriedade os bovinos foram alocados em dois piquetes de campo nativo, num sistema de rodízio, onde em um deles existiam diversas áreas de mata com abundante quantidade de *A. exotropica* (**Figura 2**). Três bovinos morreram após quatro dias nesse local, os demais foram conduzidos ao final de sete dias para uma mangueira, na qual havia um caminhão que os levaria ao frigorífico. Durante a movimentação para colocá-los no caminhão 13 bovinos morreram subitamente. Esses bovinos caíam e apresentavam durante poucos minutos, tremores musculares, com rápida evolução para morte. À inspeção *in loco* desse piquete observou-se grande quantidade de *A. Exotropica* com sinais de consumo. Realizou-se necropsia de nove desses bovinos. Após dois dias outro bovino morreu apresentando os mesmos sinais clínicos, porém não foi necropsiado.

Todos os corações foram coletados inteiros e levados separadamente do sistema respiratório para o Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) para avaliação macroscópica. Esses corações foram seccionados transversalmente, num total de quatro secções completas equidistantes entre si (**Figura 3**).

De cada coração coletou-se, separadamente, em frasco previamente identificado contendo solução de formalina tamponada 10%, oito fragmentos de regiões distintas. A ordem de coleta era: ápice, septo interventricular, ventrículo esquerdo, ventrículo direito, músculo papilar esquerdo, músculo papilar direito, átrio esquerdo e átrio direito

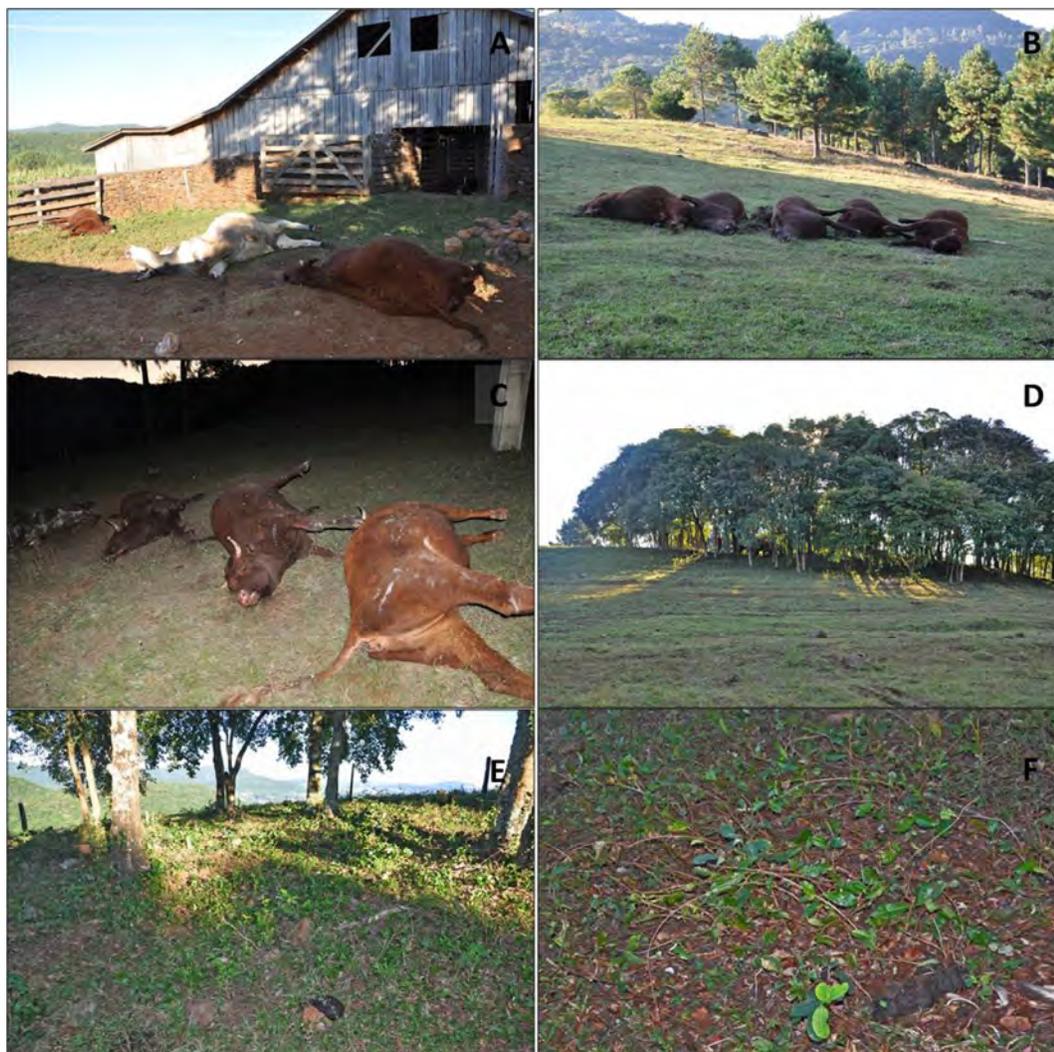


Figura 2. Aspectos gerais da propriedade. **A.** Local onde os bovinos estavam no momento em que foram movimentados para serem transportados para o frigorífico. **B e C** Carcaça de bovinos no piquete de campo nativo com área de mata ao fundo, onde havia grande quantidade de *Amorimia exotropa*. **D.** Propriedade de campo nativo com área sombreada de mata ao fundo, sem proteção para evitar que os animais se abrigassem no local. **E** Mesmo local da foto anterior, evidenciando a presença de fezes e de *Amorimia exotropa* em grande quantidade. **F.** Ausência de folhas nos cipós, evidenciando o consumo no local.

Cada amostra foi fixada por 24 horas, processada rotineiramente para histologia, incluída em parafina e cortada a 3 μ de espessura de forma seriada. Uma lâmina era corada pela técnica histoquímica de hematoxilina-eosina (HE), outra para Tricômio de Masson (TM) (*kit* Erviegas® EasyPath) e uma terceira submetida à técnica imuno-histoquímica anti-troponina C humana.

Para o teste imuno-histoquímico utilizou-se o método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. Os cortes histológicos foram confeccionados em lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath). Utilizou-se como anticorpo primário o anticorpo monoclonal anti-Troponina C cardíaca humana (Novo Castra®) na diluição 1:40 em PBS. O bloqueio da Peroxidase endógena foi feito com Peróxido de hidrogênio a 10% em metanol por 10 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se calor na panela de pressão (Dakocitomaker®), com as lâminas submersas em tampão TRIS EDTA pH 9,0, a 125°C por três minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário em câmara úmida, *overnight* a 4°C. Como cromógeno utilizou-se DAB (Dako, Carpintaria, CA, USA) e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris, após desidratadas em etanol e clarificadas em xilol.

Como controle positivo utilizou-se o coração de um bovino intoxicado por *Amorimia exotropica* com necrose de coagulação de cardiomiócitos (PAVARINI *et al.*, 2011). Já como controles negativos utilizaram-se dez corações de bovinos sem lesões histológicas em cardiomiócitos, cujas *causas mortis* eram: um caso de intoxicação por *Senecio brasiliensis*, um caso de intoxicação aguda por *Pteridium aquilinum*, um caso de Raiva e sete corações de bovinos do final da linha de abate (descarte) de frigorífico abatedouro. Todos os corações foram submetidos à avaliação macroscópica e secções idênticas aos bovinos do surto.

A partir da imuno-histoquímica realizou-se a graduação da lesão em cada uma das oito regiões cardíacas coletadas, excluídas as áreas de infarto e fibrose. Para isso, observou-se 10 campos em aumento de 400x, em secções transversais das fibras e contava-se o número de células que não apresentavam marcação positiva.

Para análise estatística utilizou-se o software SPSS V.15 (Statistical Package for Social Sciences) e a análise mais apropriada para avaliar os resultados foi a ANOVA com um fator (Análise de Variância).

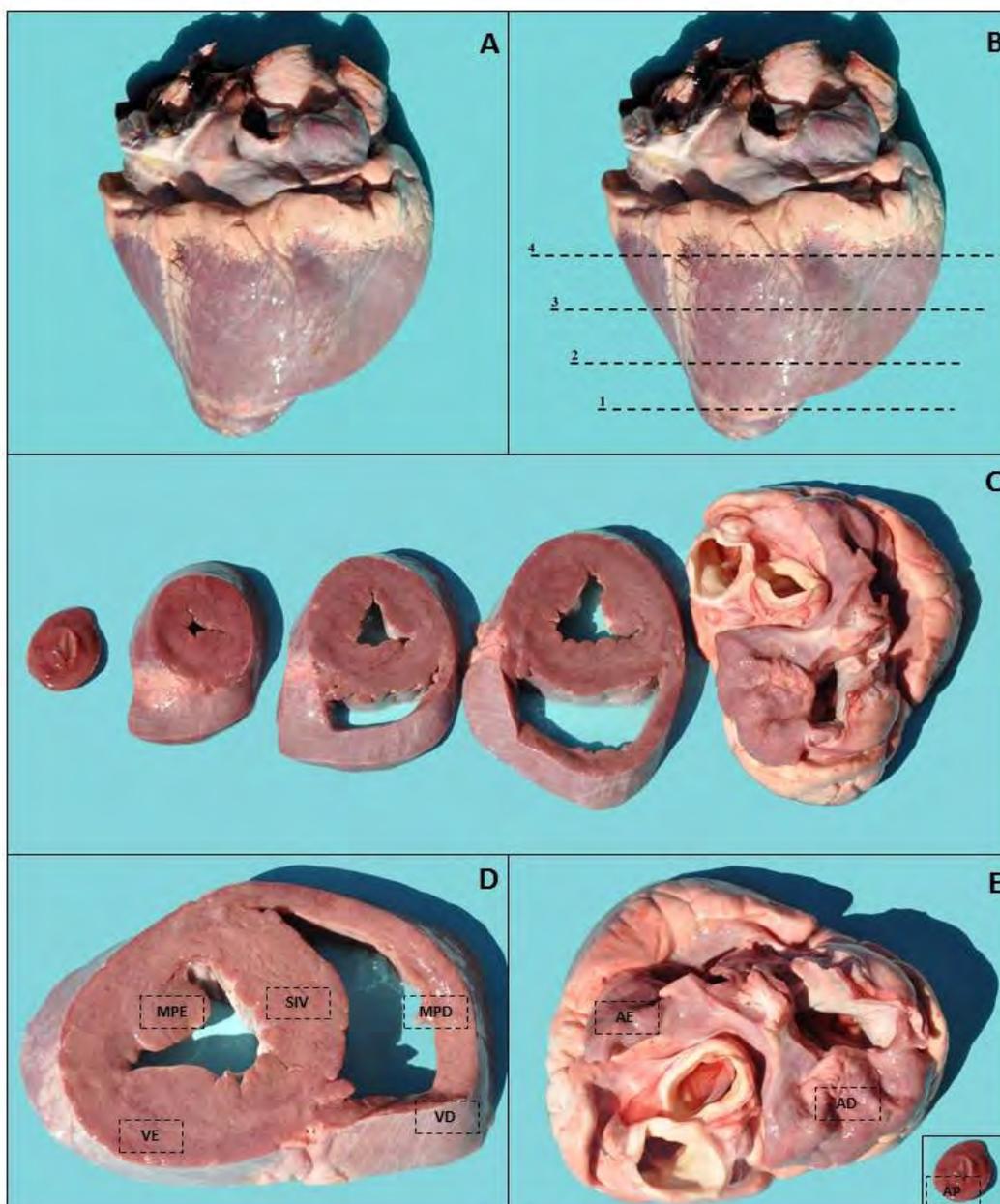


Figura 3. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. **A.** Aspecto macroscópico do coração de um bovino adulto, sem alterações. **B.** As quatro linhas tracejadas, representam os locais das secções completas transversais, equidistantes, realizadas para inspeção visual. **C.** Aspecto final do coração seccionado, desde o ápice até a base. **D e E.** Representação esquemática das áreas coletadas para avaliação histológica e imuno-histoquímica. No detalhe tracejado, fragmento do ápice (AP) cardíaco amostrado. MPE: músculo papilar esquerdo, MPD: músculo papilar direito, SIV: septo interventricular, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo.

4. RESULTADOS

À avaliação macroscópica 4/9 corações apresentaram uma área focal de lesão no músculo papilar esquerdo contíguo a parede livre do ventrículo esquerdo em maior ou menor gravidade (Bovinos 2, 5, 7 e 8). Tratava-se de lesão arredondada, de coloração que variava de branca a avermelhada, consistência idêntica ao miocárdio, bem delimitada e de 1,5-3 cm de diâmetro (**Figura 4**).

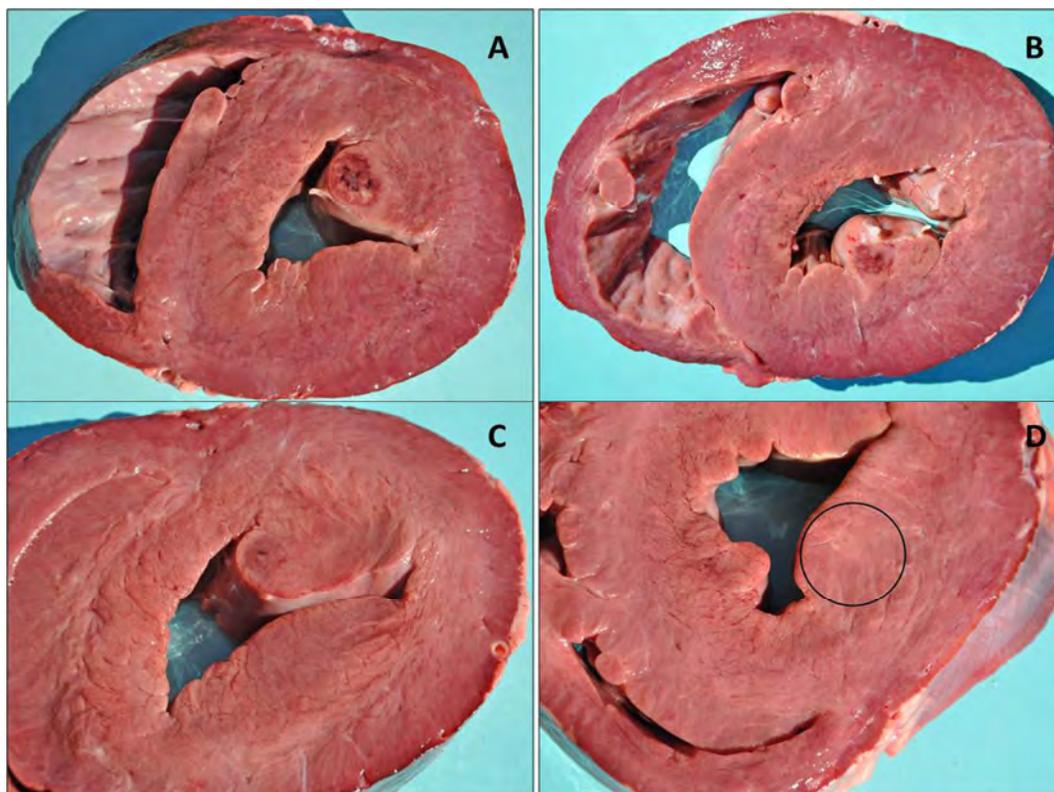


Figura 4. Aspecto macroscópico das lesões na musculatura papilar esquerda de quatro bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. **A.** Área focal, avermelhada entremeada por áreas brancacentas, bem delimitada, arredondada, de 3 cm de diâmetro (Bovino 2) **B.** Área focal, avermelhada, pouco delimitada, de 1,5 cm de diâmetro (Bovino 8) **C.** Lesão focal, bem delimitada, levemente avermelhada com pequena área focal central discretamente mais pálida, de 1,5 cm de diâmetro (Bovino 5). **D.** No detalhe, área focal discretamente pálida (Bovino 7).

Histologicamente em 9/9 corações havia múltiplos cardiomiócitos em grupos ou isolados com retração, hipereosinofilia e aspecto homogêneo do citoplasma, além de picnose nuclear e, por vezes, cariólise (**Figura 5**). Além disso, havia focos com

fragmentação de miofibrilas associadas a influxo de macrófagos e discreta proliferação de fibroblastos (**Figura 6**).

Nos músculos papilares dos bovinos 2 e 8 a alteração histológica caracterizou-se por necrose de coagulação focalmente extensa e acentuada, limitada por um halo com infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos, neutrófilos degenerados, além de tecido conjuntivo jovem e debris necróticos - infarto, (**Figura 7**). Já dos Bovinos 5 e 7, observou-se proliferação de tecido conjuntivo imaturo associado a necrose de cardiomiócitos e infiltrado de macrófagos e linfócitos (**Figura 8**). A distribuição qualitativa das lesões histológicas, de acordo com a região topográfica cardíaca está sumarizada na **Tabela 1**.

Na avaliação imuno-histoquímica a distribuição e a intensidade da lesão variaram de acordo com a região cardíaca. Todavia, todas as áreas com características histológicas de morte celular à avaliação da microscopia de luz demonstravam perda acentuada ou ausência de marcação citoplasmática para o anticorpo anti-troponina C. Observou-se ainda marcação no interior de ocasionais macrófagos nos centros das lesões e também ausência de marcação em ocasionais cardiomiócitos sem lesões histológicas.

Na **Figura 9** há a representação esquemática da distribuição quantitativa da severidade das lesões, a partir das áreas topográficas do coração de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica* através da imuno-histoquímica. Na **Figura 10** está demonstrada a representação gráfica das frequências percentuais a partir das regiões cardíacas dos nove bovinos. Na **Tabela 2** estão demonstrados o número total de cardiomiócitos necróticos (frequência) a partir da topografia cardíaca dos nove bovinos.

Na **Tabela 3** de estatísticas descritivas há a contagem média de células mortas nas áreas analisadas. Avaliando estas médias, formulou-se a hipótese de que existia diferença entre a contagem média das áreas, pois a área MPE possuía a maior média. No entanto, para obter-se maior subsídio estatístico, existem testes de comparações de médias que mostram se a diferença é estatisticamente significativa. Dessa maneira, a fim de comparar a média de mais de dois grupos, utilizou-se o teste ANOVA (Análise de Variância) e verificou-se se havia diferença de média de células mortas entre as áreas analisadas. Neste caso, os grupos a serem comparados foram Ápice, VE, VD, MPD, MPE, SIV, totalizando 6 grupos a serem comparados. A hipótese nula do teste de ANOVA é que as médias entre os grupos são iguais, ou seja, que não existe diferença

entre as médias das 6 áreas analisadas (Ápice, VE, VD, MPD, MPE, SIV). Ao rejeitar-se tal hipótese, conclui-se então que existe diferença estatística entre a média de pelo menos dois dos grupos analisados.

A **Tabela 4** indica que as médias entre os grupos analisados apresentam diferença estatística a um nível de significância de 0.000 ($F=7,88$; Sig.:0.0000). Isto significa que a média de contagem de células mortas é estatisticamente diferente entre as áreas do coração analisadas.

Para saber entre quais áreas existe diferença de média, são necessários testes complementares (**Anexo 1 – Tabela 1**) chamados de testes de comparações múltiplas de médias, que comparam os grupos 2 a 2. O teste utilizado neste trabalho foi o teste de Tukey com 5% de significância. Os resultados do teste de Tukey (**Anexo 1 – Tabela 2**) dão origem à tabela de grupos homogêneos (**Tabela 5**), que mostra quais grupos possuem médias estatisticamente diferentes entre si. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa, enquanto letras distintas indicam que existe. Dessa forma, a partir das comparações múltiplas de médias, a região MPE foi a que apresentou maior média e que esta difere estatisticamente de todas as demais áreas. Além disso, as demais áreas não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey.

A **Figura 11** traz um gráfico referente a contagem média de células mortas em relação a cada área analisada.

Nos corações dos 10 bovinos utilizados como controles, observou-se na imunohistoquímica anti-troponina C marcação difusa e acentuada no citoplasma dos cardiomiócitos de todas as áreas amostradas (**Figura 12**).

Os átrios direito e esquerdo de todos os corações não apresentaram lesões histológicas, nem imunohistoquímicas.

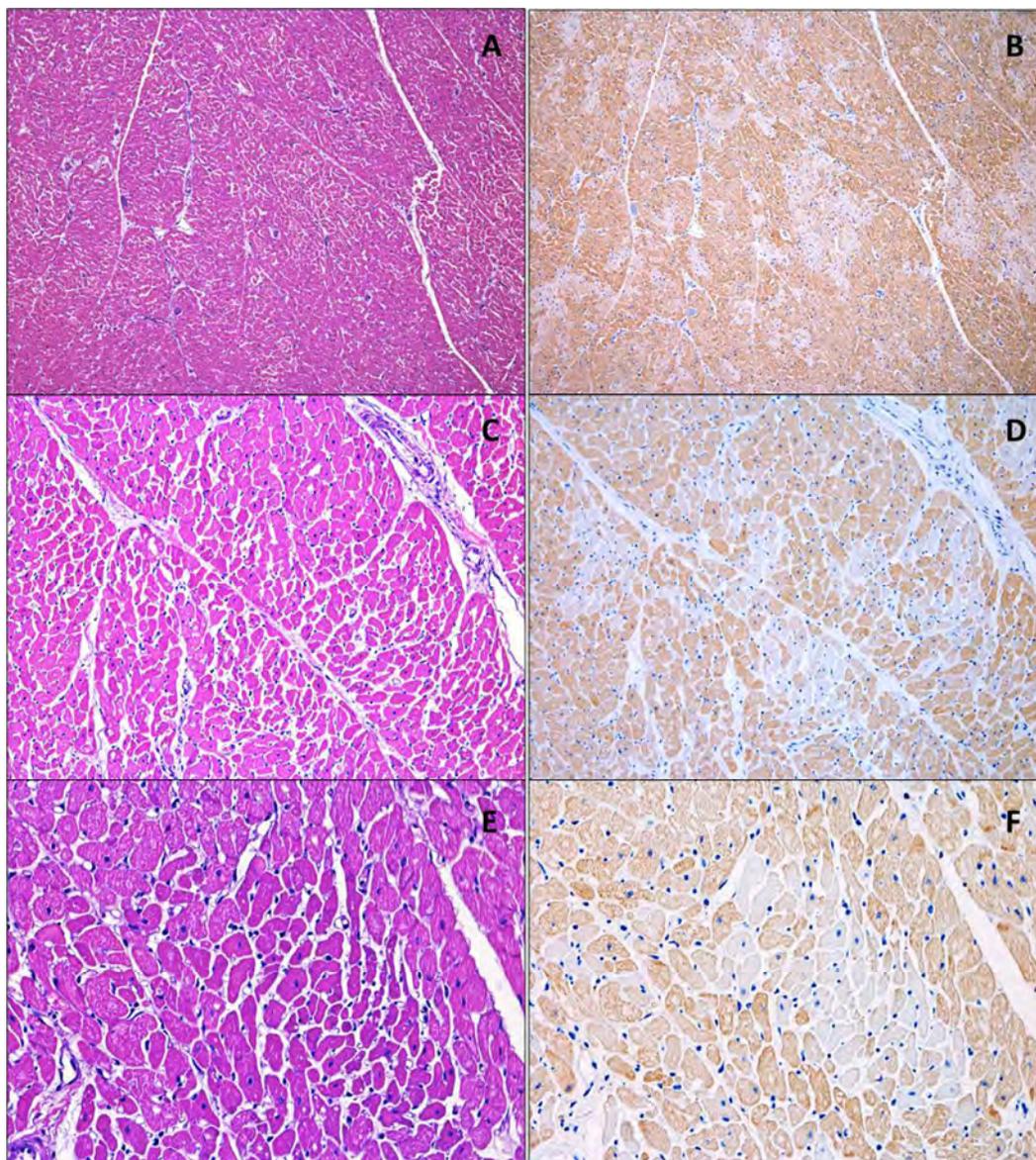


Figura 5. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropa*. A, C e E. Áreas multifocais a coalescentes de hipereosinofilia, retração e aspecto homogêneo citoplasmático de cardiomiócitos. HE, 100x, 200x e 400x, respectivamente. B, D e F. Ausência de marcação citoplasmática em cardiomiócitos que apresentavam lesões de hipereosinofilia, IHQ anti-Troponina C, 100x, 200x e 400x.

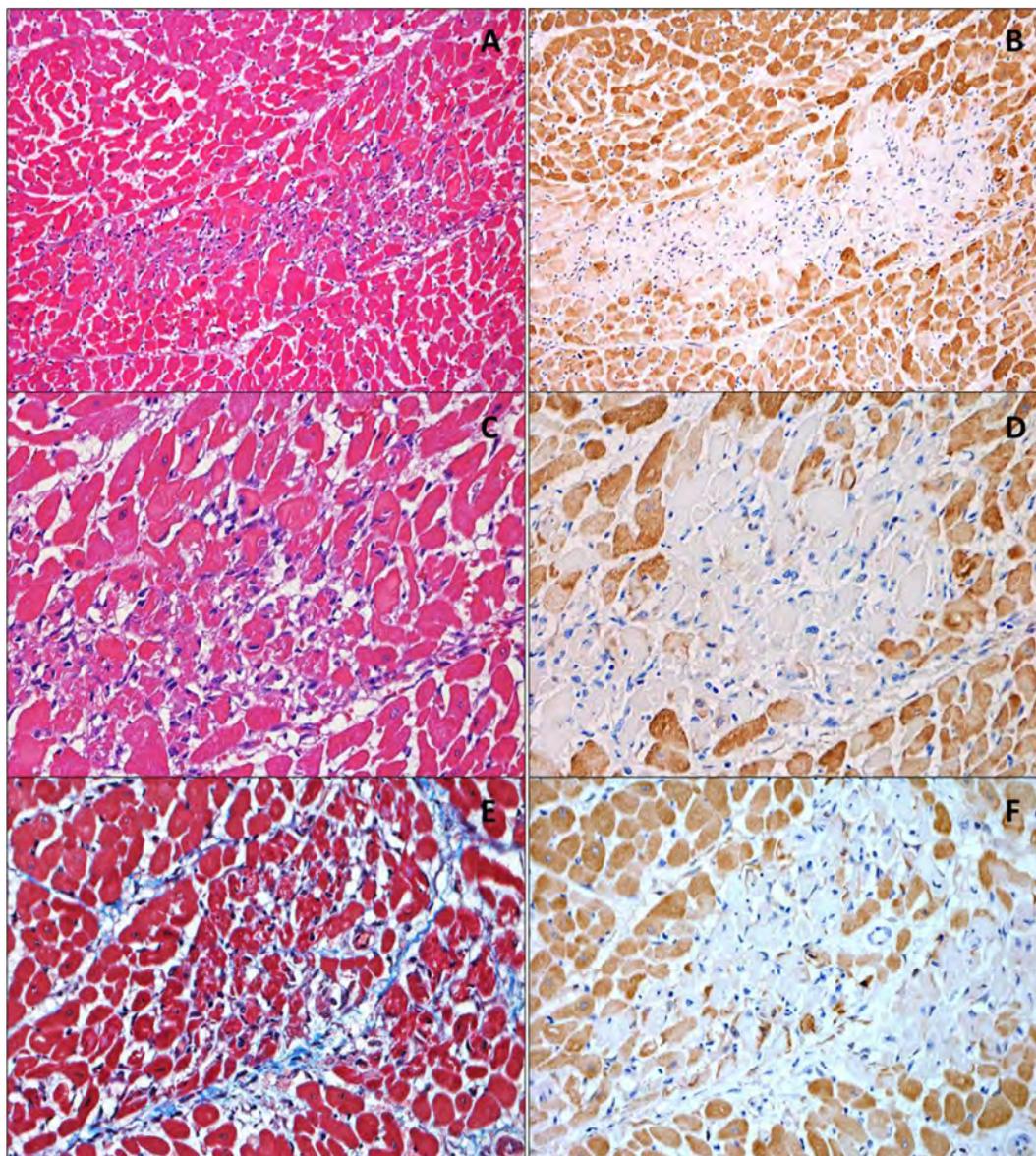


Figura 6. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropa*. **A e C.** Área focalmente extensa de necrose de coagulação, com fragmentação dos cardiomiócitos além de fibroplasia discreta e influxo de macrófagos. HE, (200x e 400x, respectivamente). **E.** Proliferação de tecido conjuntivo no miocárdio evidenciada pela coloração de Tricrômio de Masson, 400x. **B, D e F.** Ausência e diminuição de intensidade de marcação citoplasmática em cardiomiócitos em áreas correspondentes. IHQ anti-Troponina C, (200x, 400x e 400x).

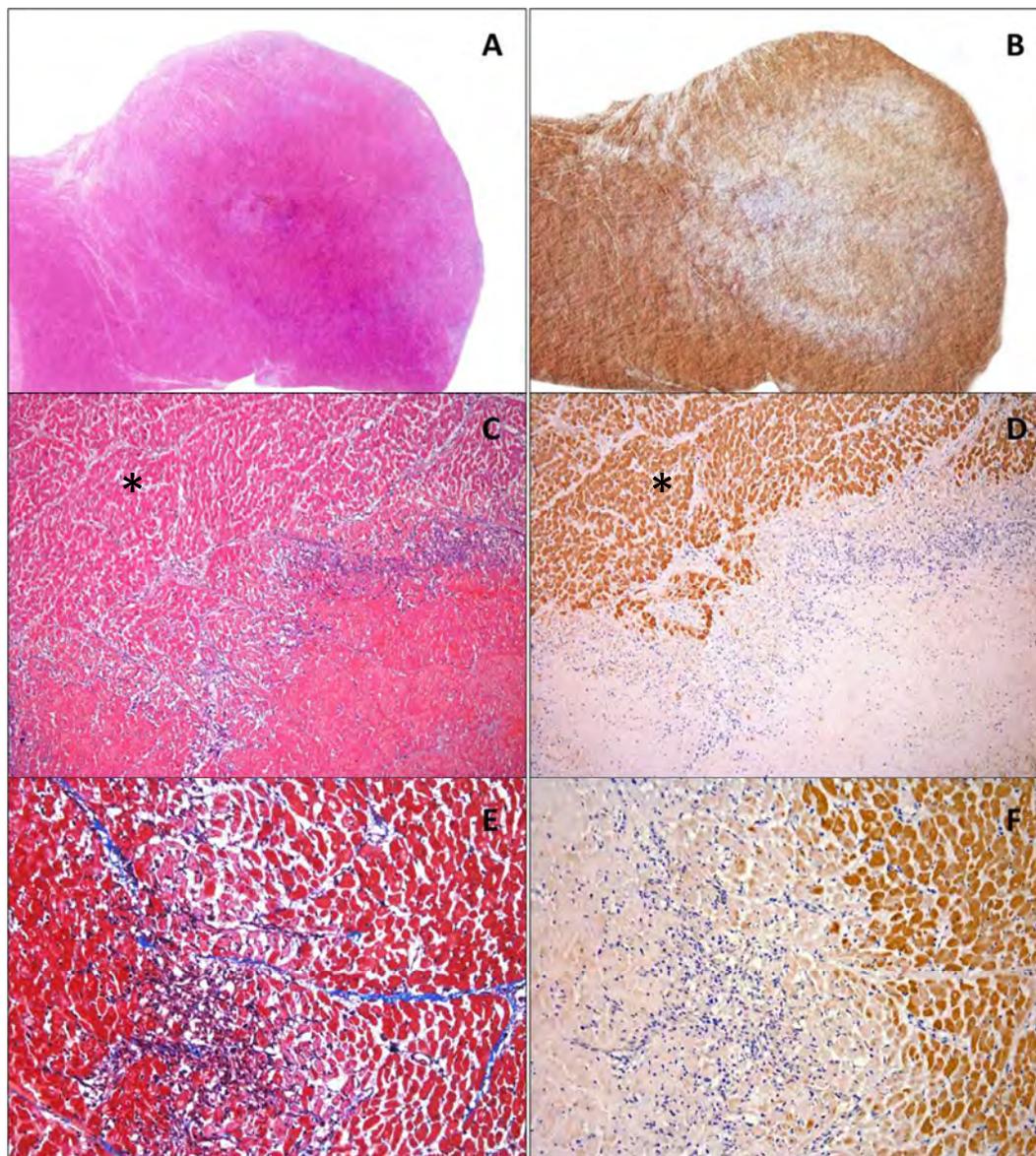


Figura 7. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *A. exotropa*. Músculo papilar esquerdo, Bovinos 2 e 8. A. Imagem submacroscópica que evidencia área central hiperosinofílica e bem delimitada (infarto), HE. **B.** Área idêntica a anterior demonstrando perda de marcação na IHQ anti-Troponina C em área de infarto. **C.** Área de transição do infarto, com três regiões distintas: cardiomiócitos sem alteração (asterisco), área marginal de infiltrado inflamatório e necrose de coagulação, HE, 100x. **D.** Mesma área da Fig. C contrastando a intensa marcação imuno-histoquímica na área sem lesão (asterisco) e a perda total na área de infarto, IHQ anti-Troponina C, 100x. **E.** Área focalmente extensa de discreta fibroplasia na margem do infarto, TM, 200x. **F.** Área central do infarto com acentuada ausência de marcação e presença em região periférica, IHQ anti-Troponina C, 200x.

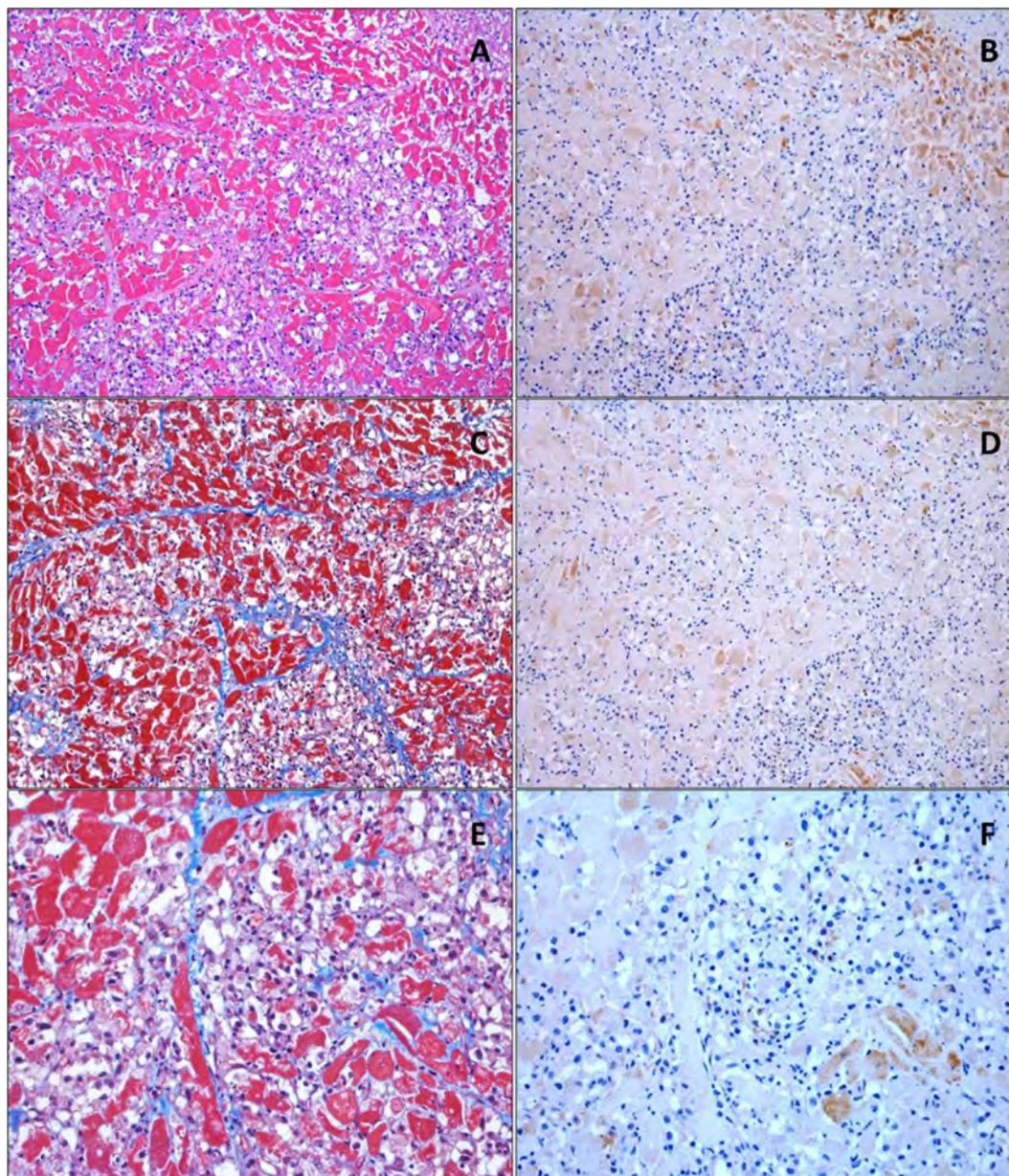


Figura 8. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em cortes seriados de corações de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropa*. Músculo papilar esquerdo, Bovinos 5 e 7. **A, C e E.** Áreas de infarto em fase de reparação, na qual há moderada fibroplasia e infiltrado macrofágico e linfocitário, entremeadas por cardiomiócitos hipereosinofílicos e fragmentados, HE, 200x e TM, 200x e 400x respectivamente. **B, D e F.** Acentuada perda e diminuição da marcação citoplasmática em cardiomiócitos em áreas de infarto em fase de reparação, IHQ anti-Troponina C, 200x, 200x e 400x respectivamente. 200x.

Tabela 1. Distribuição qualitativa das lesões histológicas de acordo com a região topográfica cardíaca em bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*.

	Hipereosinofilia e retração citoplasmática						Fragmentação de fibras associada a infiltrado inflamatório e proliferação de tec. conj. imaturo						Infarto Agudo						Infarto em fase de reparação						Proliferação de tecido conjuntivo maduro intersticial						Infiltrado intersticial, predominantemente, perrivascular linfocitário multifocal					
	AP	VE	VD	SIV	MPE	MPD	AP	VE	VD	SIV	MPE	MPD	AP	VE	VD	SIV	MPE	MPD	AP	VE	VD	SIV	MPE	MPD	AP	VE	VD	SIV	MPE	MPD	AP	VE	VD	SIV	MPE	MPD
BOV 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BOV 2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BOV 3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
BOV 4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
BOV 5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BOV 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BOV 7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BOV 8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BOV 9	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	

AP: ápice; **VE:** ventrículo esquerdo, **VD:** ventrículo direito; **SIV:** septo interventricular; **MPE:** músculo papilar esquerdo; **MPD:** músculo papilar direito; (+) : presença e (-) ausência de lesão; **BOV=** bovino.

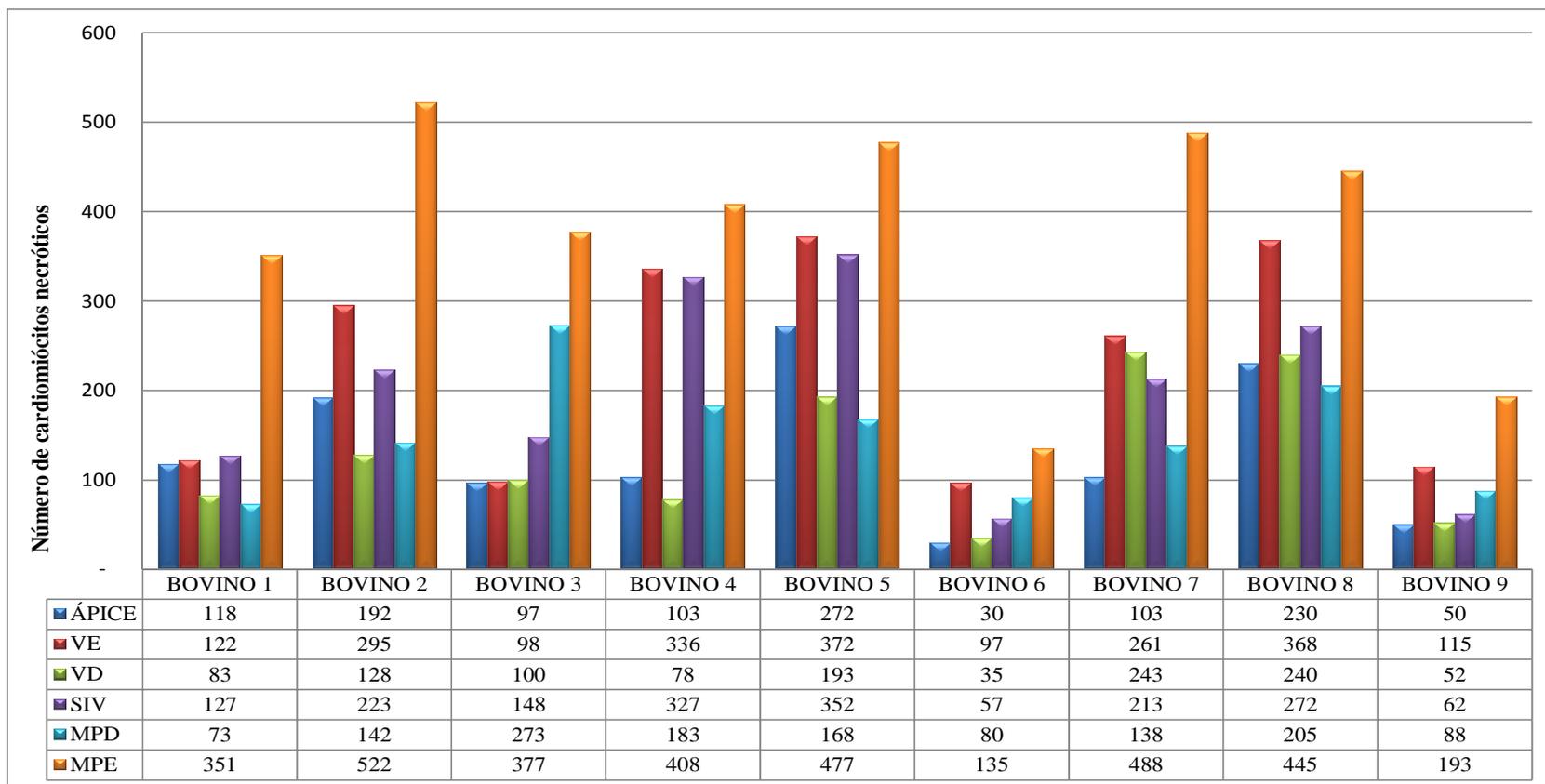


Figura 9. Gráfico esquemático da distribuição quantitativa da severidade das lesões, a partir das áreas topográficas do coração de bovinos intoxicados naturalmente por *Amorimia exotropica*. VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito; SIV: septo interventricular; MPE: músculo papilar esquerdo; MPD: músculo papilar direito;

Tabela 2. Distribuição quantitativa do número total de cardiomiócitos necróticos a partir da topografia cardíaca dos nove bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*.

Topografia Cardíaca	Frequência*	Frequência Relativa	Frequência Percentual	Frequência Acumulada
ÁPICE	1195	0,11	10,93	10,93
VE	2064	0,19	18,87	29,80
VD	1152	0,11	10,53	40,33
SIV	1781	0,16	16,28	56,61
MPD	1350	0,12	12,34	68,95
MPE	3396	0,31	31,05	100,00
TOTAL	10938			

* número total de cardiomiócitos com ausência de marcação imuno-histoquímica. VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito; SIV: septo interventricular; MPE: músculo papilar esquerdo; MPD: músculo papilar direito;

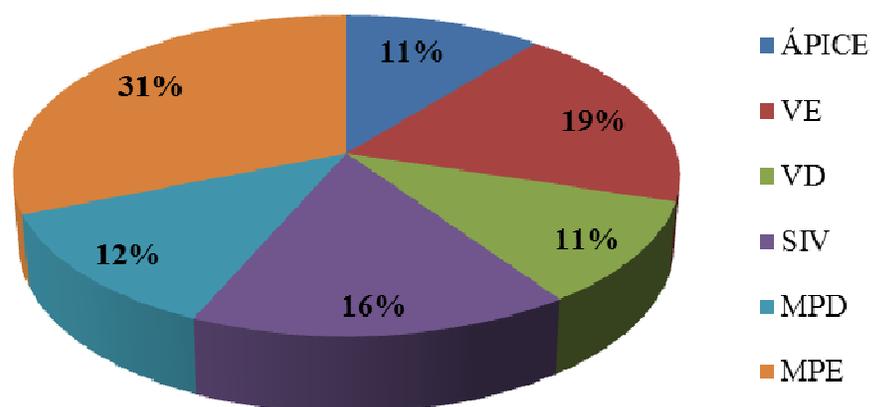


Figura 10. Representação gráfica da frequência percentual de lesões em cardiomiócitos dos bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito; SIV: septo interventricular; MPE: músculo papilar esquerdo; MPD: músculo papilar direito.

Tabela 3. Tabela de estatísticas descritivas a partir da topografia cardíaca dos nove bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança para média de 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
Ápice	9	132.78	81.42	27.14	70.20	195.36
VE	9	229.33	120.22	40.07	136.92	321.74
VD	9	128.00	78.84	26.28	67.40	188.60
SIV	9	197.89	107.59	35.86	115.19	280.59
MPD	9	150.00	65.62	21.87	99.56	200.44
MPE	9	377.33	133.24	44.41	274.91	479.75
Total	54	202.56	129.42	17.61	167.23	237.88

Tabela 4. Tabela ANOVA para avaliação de diferença estatística inter e intra-grupos.

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Inter-grupos	400280.89	5	80056.18	7.88	.0000
Intra-grupos	487460.44	48	10155.43		
TOTAL	887741.33	53			

Tabela 5. Tabela de grupos homogêneos em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*.

Área do Coração	Contagem Média	Grupos Homogêneos
VD	128.00	a
ÁPICE	132.78	a
MPD	150.00	a
SIV	197.89	a
VE	229.33	a
MPE	377.33	b

a= não há diferença significativa; b= há diferença significativa.

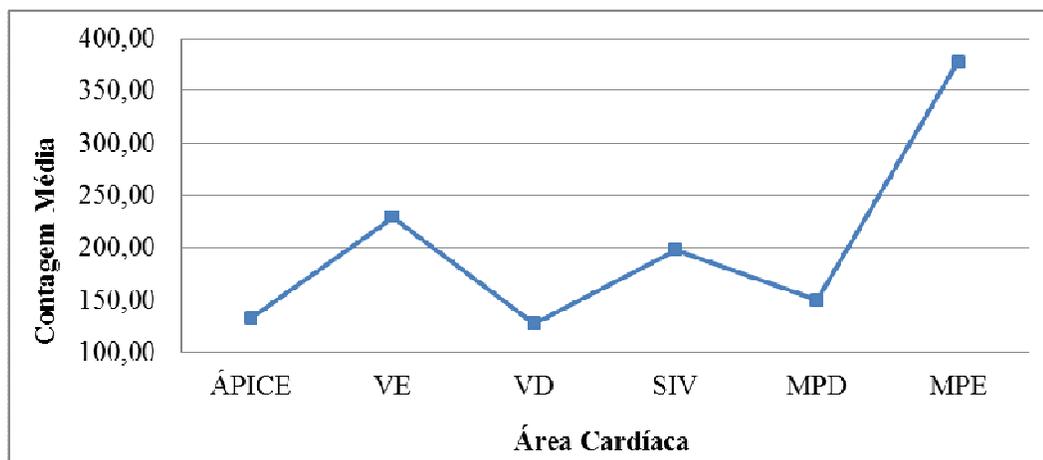


Figura 11. Gráfico de distribuição da contagem média de células mortas para cada área topográfica analisada de todos os bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*.

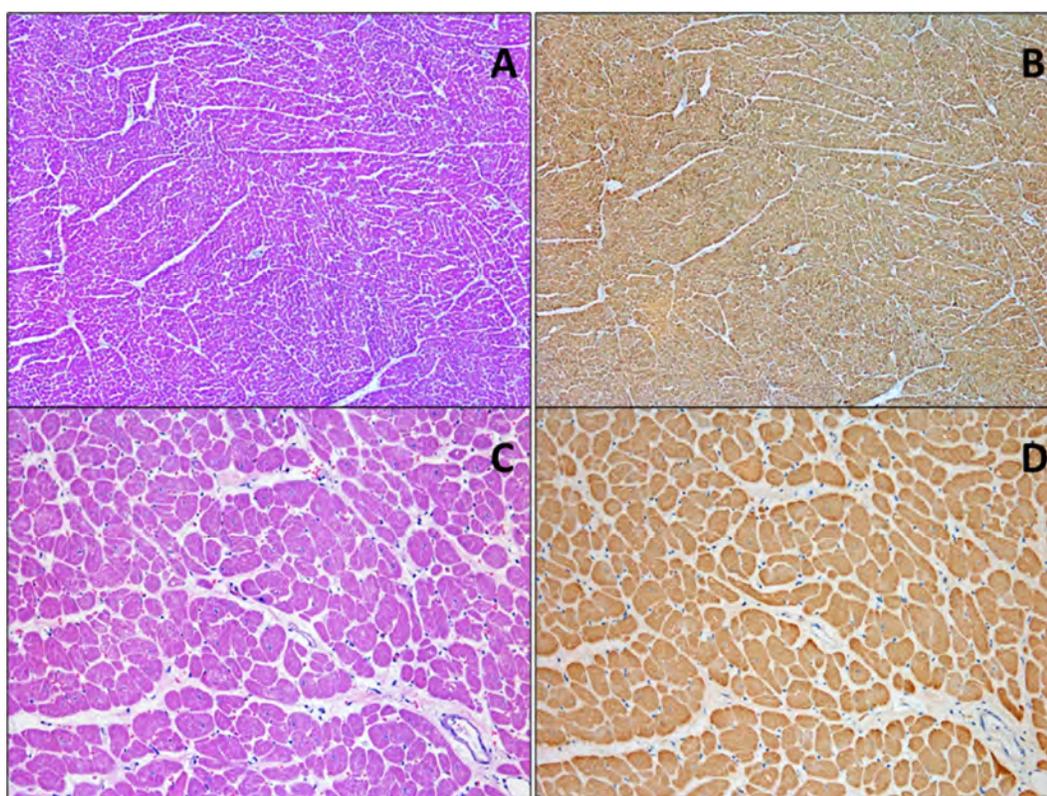


Figura 12. Avaliação histológica e imuno-histoquímica em cortes seriados de corações de bovinos controles. Coração. **A e C.** Cardiomiócitos sem alteração, HE, 40x e 200x. **B e D.** Intensa marcação citoplasmática em cardiomiócitos sem alteração, IHQ anti-Troponina C, 40x e 200x.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de intoxicação por *Amorimia exotropica* nesse surto baseou-se nos achados epidemiológicos, sinais clínicos e patológicos associados ao sinal de consumo da planta na propriedade.

Amorimia (Mascgania) exotropica é nativa da região sul do Brasil e no Rio Grande do Sul encontra-se na área metropolitana de Porto Alegre e na serra gaúcha. As perdas econômicas associadas com a intoxicação pela planta nestas regiões do estado são importantes, porém desconhecidas (PAVARINI *et al.*, 2011). Embora intoxicações ocorram durante todo o ano, nos meses de inverno no Sul do país há concentração dos casos devido à fome e ao consumo de oportunidade durante condições climáticas adversas. São Francisco de Paula é um município serrano, onde há a planta e neste surto as condições epidemiológicas que promoveram sua ocorrência foram escassez de pastagem e alta lotação animal.

O evento que precipitou as mortes dos bovinos deste relato, fora a movimentação para embarque para o frigorífico. Caracteristicamente, estas situações rotineiras de manejo desencadeiam as mortes e basearam a criação do termo “plantas que causam morte súbita” por Tokarnia e Dobereiner (1982). Atualmente o grupo é chamado plantas que causam morte súbita associada ao exercício (DUARTE *et al.*, 2013; PESSOA *et al.*, 2013). A associação entre o consumo de plantas desse grupo e a estimulação física desses animais, reforça a possibilidade de que o aumento na liberação de catecolaminas durante a atividade, aumenta a força contrátil miocárdica (efeito ionotrópico positivo), a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo) e o débito cardíaco (GUYTON; HALL, 2002), tornando assim os cardiomiócitos mais sensíveis ao aumento da demanda energética e de oxigênio, precipitando os efeitos tóxicos do monofluoroacetato de sódio (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Em seres humanos o exercício físico extremo ou de resistência podem levar a aumentos significativos da troponina I plasmática (indicativa de lesão de cardiomiócitos), tanto pelo aumento do consumo do O₂ por parte do miocárdio, como também por uma potencial diminuição da perfusão coronária por vasoespasm induzido pelas catecolaminas endógenas liberadas no momento do exercício (JEREMIAS; GIBSON, 2005).

Dentre os sinais clínicos relacionados com a intoxicação em bovinos, tanto diretamente pelo monofluoroacetato de sódio (NOGUEIRA *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et*

al., 2011), quanto pelas plantas do grupo MSAE (GAVA *et al.*, 1998; PEIXOTO, 2011), a taquicardia é, frequentemente, relatada pelos autores. As taquiarritmias supraventriculares e ventriculares, acarretam aumento do consumo de O₂ por parte do miocárdio, ao mesmo tempo que diminuem a sua perfusão, pelo inerente encurtamento da diástole, principal fase do ciclo cardíaco em que ocorre perfusão do miocárdio. Nos bovinos intoxicados por plantas do grupo MSAE a taquicardia ventricular é descrita (PEIXOTO, 2011) e é precipitada pela movimentação e/ou exercício dos animais durante o manejo como no presente caso.

À inspeção, durante o exame de necropsia, do coração de bovinos intoxicados por *A. exotropica* e outras plantas que compõe o grupo MSAE, há descrições de petéquias e equimoses no epicárdio multifocais e coágulo cruórico na luz ventricular esquerda (PAVARINI *et al.*, 2011). Contudo tais alterações são inespecíficas e também observadas em bovinos que morrem de causas não relacionadas à insuficiência cardíaca aguda. Em quatro corações, neste estudo havia uma área de lesão focal macroscópica no músculo papilar esquerdo. Histologicamente estas áreas caracterizavam-se por infarto bem delimitado por zona de demarcação. A partir disso aventou-se a hipótese de que um espasmo das artérias coronarianas, devido à vasoconstrição secundária à hiperestimulação α -adrenérgica (JEREMIAS; GIBSON, 2005; MAHAJAN *et al.*, 2006; LAZERRI, 2008) nesses bovinos durante o exercício, poderia justificar a isquemia transitória desse grupo de cardiomiócitos, além de tratar-se de um evento potencialmente fatal, acompanhado de morte súbita em decorrência de hipoperfusão e falência cardíaca.

Dois bovinos apresentavam infiltrado macrofágico, linfocitário e fibroplasia imatura em áreas de necrose de coagulação dos cardiomiócitos, sugerindo um curso subagudo. Igualmente ao observado nesses animais, em casos de intoxicação por *Dicaphetalum cymosum* (*Gifblaar*) em bovinos, múltiplos focos de necrose miocárdica, acompanhadas de infiltrado linfocitário e fibroplasia imatura são, ocasionalmente, descritos em savanas infestadas pelo *Gifblaar* (KELERMAN *et al.*, 2005). Acredita-se que isso possa ocorrer devido à quantidade da planta consumida em proporção ao peso dos animais, configurando a ingestão de subdoses da planta que resultariam em cicatrizes no miocárdio (KELERMAN *et al.*, 2005). Nesta mesma corrente, Soares *et al.* (2011b) demonstrou experimentalmente em coelhos intoxicados com subdoses de *Amorimia exotropica* a formação de fibrose nos corações desses animais.

Estatisticamente, demonstrou-se que os cardiomiócitos do músculo papilar esquerdo foram os mais afetados nos animais deste estudo. Soares *et al.* (2011b) demonstrou que coelhos que receberam subdoses de *Amorimia exotropica* desenvolviam fibrose cardíaca, especialmente, no músculo papilar esquerdo. Fisiologicamente não há diferenças entre cardiomiócitos ventriculares e dos músculos papilares (GUYTON; HALL, 2002) em seres humanos, contudo nos casos de intoxicação em bovinos o músculo papilar esquerdo demonstrou ser mais susceptível aos eventos tóxicos do monofluoracetato de sódio.

A necrose de coagulação observada em maior ou menor proporção nas regiões topográficas cardíacas amostradas no coração dos bovinos deve resultar do desequilíbrio energético (dano mitocondrial), aos quais estes animais estão submetidos e da deficiente relação entre o fornecimento/consumo de O₂ e nutrientes. Esta lesão justifica-se nos animais que ingerem *Amorimia exotropica*, uma vez que comprovadamente há a presença do MS como princípio tóxico (LEE *et al.*, 2012), substância reconhecidamente mitocôndrio-tóxica, e em herbívoros como: coelhos, equinos, caprinos, ovinos e bovinos, com ação, predominantemente, cardíaca (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Estudos bioquímicos demonstram que o monofluoracetato de sódio interrompe o ciclo de Krebs, por produção do inibidor específico, fluorocitrato aconitase, e subsequente acumulação mitocondrial do citrato. Na avaliação ultraestrutural do coração de coelhos intoxicados experimentalmente com *A. exotropica*, ficou evidenciada intensas lesões mitocondriais, caracterizadas por inchaço, desorganização, rompimento de criptas e acúmulo de líquido (SOARES, 2011a). O mesmo autor sugere em seu estudo que devido ao fundamental papel exercido pelas mitocôndrias na reserva cardíaca, as alterações mitocondriais podem ser atribuídas ao esgotamento de energia e disfunção das bombas iônicas com consequente desequilíbrio osmótico sarcoplasmático e influxo de líquidos. Esta acumulação de fluido intracelular foi responsabilizada por provocar a separação e ruptura de miofibrilas, que levam à desestruturação e extinção dos sarcômeros, seguido de dilatação e ruptura dos túbulos T e, finalmente, o colapso do miocárdio (SOARES, 2011a).

O uso de troponinas como importante indicador imuno-histoquímico de lesão cardíaca já foi demonstrado em bovinos (TUNCA *et al.*, 2008; PAVARINI *et al.*, 2011), desta forma, como anteriormente, no presente trabalho sua utilização auxiliou na identificação precisa de cardiomiócitos com lesão. Todos os cardiomiócitos com

características histológicas (discretas a severas) de morte celular, não apresentaram marcação anti-troponina C, o que demonstra alta sensibilidade do marcador humano em bovinos.

Os diagnósticos diferenciais de morte súbita na espécie bovina na região Sul do Brasil devem incluir doenças e intoxicações agudas assintomáticas ou oligossintomáticas, tais como carbúnculo hemático (SCHILD et al., 2006), fulguração (WATANABE et al., 2010), intoxicações por *Nerium oleander* (PEDROSO et al., 2009) e *Ateleia glazioviana* (GAVA et al., 2001), timpanismo espumoso (DALTO et al., 2009), deficiência de cobre (MARQUES et al., 2003) e intoxicação por plantas que contêm ácido cianídrico (RIET-CORREA; MENDES, 2007). Todavia, em tais doenças e intoxicações existem lesões características e aspectos epidemiológicos distintos.

6. CONCLUSÃO

Em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa* pode haver lesão macroscópica no músculo papilar esquerdo, caracterizada por infarto.

O músculo papilar esquerdo na macroscopia, histologia e imuno-histoquímica para Troponina C é a região mais acometida nos casos de intoxicação por *Amorimia exotropa*.

O uso de Troponina C humana, como anticorpo primário na imuno-histoquímica apresenta alta sensibilidade para a espécie bovina e seu uso é um importante método auxiliar na identificação de injúria cardíaca nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- ADIN, D.B. et al. Comparison of canine cardiac troponin I concentrations as determined by 3 analysers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.1136-1142, 2006.
- ALPIN, T.H.E.; KING, D.R.; OLIVER, A.J. The distribution and ecology of the toxic species of *Gastrolobium* and *Oxylobium* in South-western Australia in relation to the tolerance of native animals to fluoroacetate. **Toxicon**, n.21, p. 21–24, 1983.
- ANDERSON, W.R. Eight Segregates from the Neotropical Genus *Mascagnia* (Malpighiaceae). **Novon**, v.16, n. 2, p. 168-204, 2006.
- BURGENER, I.A. et al. Cardiac Troponins as Indicators of Acute Myocardial Damage in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.277-283, 2006.
- DALTO A.G.C., et al.. Timpanismo espumoso em bovinos leiteiros em pastagem de *Trifolium* spp. (Leg. Caesalpinoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p401-403, 2009.
- DUARTE, A.L.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p1294-1301, 2013.
- FENG, Y.J. et al. Comparison of cardiac troponin I, creatine kinase-MB, and myoglobin for detection of acute ischemic myocardial injury in a swine model. **American Journal of Clinical Pathology**, v.110, p.70-77, 1998.
- FONFARA, S. et al. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. **Veterinary Journal**, v.184, p.334-339,2010.
- GAVA, A. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia* sp. (Malpighiaceae), no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 16-20, 1998.
- GAVA, A. et al. Intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 49-59, 2001.
- GETTY, R. Coração e Artérias de Ruminantes. In:_____. **SISSON/GROSSMAN Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ª edição. Guanabara Koogan, v.1, p. 900-903, 1986.
- GODOY, H. M.; CARMEN, V. M.. Myocardial adenine nucleotides, hexose phosphates and inorganic phosphate, and the regulation of phosphofructokinase activity during fluoroacetate poisoning in the rat. **Biochemistry Pharmacology**. v. 23, p. 3179-3189, 1974.
- GUNES, V. et al. Assay of cardiac troponins in the diagnosis of myocardial degeneration due to foot-and-mouth disease in a calf. **Veterinary Record**, v. 156, n. 22, p. 714-715, 2005.
- GUYTON, A.C; HALL, J.E. Unidade III – O Coração. In:_____. **Tratado de Fisiologia Médica**. Guanabara Koogan, 10ª ed. Rio de Janeiro, 2002, p. 92 – 133.
- IBGE 2012. Produção da Pecuária Municipal (PPM). Vol.39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro - RJ. 63p

- JEREMIAS A.; GIBSON C.M. Narrative review: alternative causes for elevated cardiac troponin levels when acute coronary syndromes are excluded. **Annals of Internal Medicine**, v. 142, p.786-791, 2005.
- KELLERMAN T.S, et al. 2005. Fluoroacetate poisoning by African Dichapetalacea: Gifblaar poisoning. In:_____. **Plant Poisonings and mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa**. 2ed. Oxford University Press, Cape Town, p. 146-153.
- KREBS H.C., KEMMERLING W.; HABERMEHL G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. **Toxicon**, v.32, p.909-913, 1994.
- LAZZERI, C. et al. Troponin I in the intensive care unit setting: from the heart to the heart. **Internal and Emergency Medicine**, v. 3, p.9-16, 2008.
- LEE, S.T. et al.. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon**, v. 60, p. 791-796, 2012.
- MAHAJAN N. et al. Elevated troponin level is not synonymous with myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v.11, p.442-449, 2006.
- MAMEDE, M.C.H.; AMORIM, A.M.A.; EBASTIANI, R. 2010. Malpighiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Disponível em:** <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: junho 2013.
- MARQUES, A.P.; et al. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 21-32, 2003.
- MELLANBY, R.J.; et al. Serum cardiac troponin I concentrations in cattle with pericarditis. **Veterinary Record**, v. 161, n. 13, p.454-455, 2007.
- NEUWALD, E.B. et al.. Increase in Cardiac Troponin I in a Lamb with Tetralogy of Fallot. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 10, p. 1371–1373, 2013.
- NOGUEIRA V.A.; et al. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n. 7, p. 533-540, 2010.
- NOGUEIRA, V.A.; et al. Intoxicação por monofluoroacetato em animais¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 823-838, 2011.
- NOVÁK, L.; MISUSTOVÁ, J.; HOSEK, B. Course of respiratory exchange and body temperature in mice after repeated administration of monofluoroacetate: An indicator of aconitase activity *in vivo*. **Physiol Bohemoslov**, v. 21, p.53-61, 1972.
- OLIVEIRA, M.M. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Experientia**, v.19, p.586–587, 1963.
- PAVARINI, S.P.; et al. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Amorimia exotropica* (*Malpighiaceae*) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.4, p.291-296, 2011.
- PAVARINI, S.P.; et al. Decreased expression of cardiac troponin C is associated with cardiac lesions in *Amorimia exotropica* poisoned cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.10, p.1005-1008, 2012.

- PEDROSO P.M.O., et al. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 213-218, 2007.
- PEDROSO P.M.O., et al.. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p.404-408, 2009.
- PEIXOTO, T.C. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais da intoxicação por monofluoracetato de sódio em ovinos. Dissertação de mestrado, UFRRJ, 2010.
- PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p.752-758, 2013.
- PROUDFOOT, A.T.; BRADBERRY, S.M.; VALE, J.A. Sodium fluoroacetate poisoning. **Toxicol Rewien**, v. 25, n. 4, p. 213-219, 2006.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS R.M.T. Intoxicação por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.
- RIET-CORREA F.; MENDEZ M.C. 2007. Intoxicação por plantas e micotoxinas. In: _____. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. v.2. 3ed. Pallotti, Santa Maria, 694p.
- RISHNIW, M.; BARR, S.C.; SIMPSON, K.W. et al. Cloning and sequencing of the canine and feline cardiac troponin I genes. **American Journal Veterinary Research**, v.65, p.53-58, 2004.
- RISSI D.R.; et al. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n.7, p. 261-268, 2007.
- ROSS, M.H; PAWLINA, W. Sistema Cardiovascular. In:_____. **Histologia texto e atlas em correlação com biologia celular e molecular**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 367 – 396, 2008.
- SCHILD A.L. et al. Anthrax in cattle in southern Brazil, 1978-2006. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n. p. 243-248, 2006.
- SOARES, M.P. Intoxicação por *Amorimia* (*Mascagnia*) exotrópica: Estudo dos casos espontâneos em bovinos e intoxicação experimental em coelhos. **Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2011a.
- SOARES, M.P. et al. *Amorimia exotrópica* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.6, p.1223-1229, 2011b.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER J. Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n.1, p.17-20, 1982.
- TOKARNIA C.H., et al. 2012. **Plantas Tóxicas do Brasil**. 2ª ed. Editora Helianthus: Rio de Janeiro, p. 566.
- TOKARNIA, C.H. et al. Intoxicação por um “tingui” (*Mascagnia rigida* Griseb.) em bovinos no Nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v.4, p.203-205, 1961.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. Intoxicação por *Mascagnia pubiflora* em bovinos no Estado de Mato Grosso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.8, p.61-68, 1973.

TOKARNIA, C.H. et al. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, p.1-10, 1990.

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

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Editora Artmed: São Paulo, p.466-663, 2000.

WATANABE T.T.N. et al. Fulguração como causa de morte em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.243-245, 2010.

ANEXO I

Tabela 1. Tabela dos testes e comparações múltiplas de médias.

Comparações múltiplas

Variable dependiente: Contagem

HSD de Tukey

(I) Grupo_num	(J) Grupo_num	Diferencia de médias (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de confiança de 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
Ápice	VE	-96.56	47.51	.3398	-237.55	44.44
	VD	4.78	47.51	1.0000	-136.21	145.77
	SIV	-65.11	47.51	.7440	-206.10	75.88
	MPD	-17.22	47.51	.9991	-158.21	123.77
	MPE	-244.56*	47.51	.0001	-385.55	-103.56
VE	Ápice	96.56	47.51	.3398	-44.44	237.55
	VD	101.33	47.51	.2882	-39.66	242.32
	SIV	31.44	47.51	.9852	-109.55	172.44
	MPD	79.33	47.51	.5577	-61.66	220.32
	MPE	-148.00*	47.51	.0345	-288.99	-7.01
VD	Ápice	-4.78	47.51	1.0000	-145.77	136.21
	VE	-101.33	47.51	.2882	-242.32	39.66
	SIV	-69.89	47.51	.6838	-210.88	71.10
	MPD	-22.00	47.51	.9972	-162.99	118.99
	MPE	-249.33*	47.51	.0000	-390.32	-108.34
SIV	Ápice	65.11	47.51	.7440	-75.88	206.10
	VE	-31.44	47.51	.9852	-172.44	109.55
	VD	69.89	47.51	.6838	-71.10	210.88
	MPD	47.89	47.51	.9130	-93.10	188.88
	MPE	-179.44*	47.51	.0055	-320.44	-38.45
MPD	Ápice	17.22	47.51	.9991	-123.77	158.21
	VE	-79.33	47.51	.5577	-220.32	61.66
	VD	22.00	47.51	.9972	-118.99	162.99
	SIV	-47.89	47.51	.9130	-188.88	93.10
	MPE	-227.33*	47.51	.0002	-368.32	-86.34
MPE	Ápice	244.56*	47.51	.0001	103.56	385.55
	VE	148.00*	47.51	.0345	7.01	288.99
	VD	249.33*	47.51	.0000	108.34	390.32
	SIV	179.44*	47.51	.0055	38.45	320.44
	MPD	227.33*	47.51	.0002	86.34	368.32

*. A diferença de médias é significativa ao nível de 0.05.

Tabela 2. Resultados do Teste de Turkey 5% de significância.HSD Turkey^a

Grupo_num	N	Grupos homogêneos para alfa = .05	
		1	2
VD	9	128.0000	
Ápice	9	132.7778	
MPD	9	150.0000	
SIV	9	197.8889	
VE	9	229.3333	
MPE	9		377.3333
Sig.		.288	1.000

a.usa o tamanho amostral da média harmônica = 9.000.