

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À
INTOXICAÇÃO POR MONOFLUORACETATO EM OVINOS**

Stephanie Carrelo de Lima

CAMPO GRANDE, MS
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À
INTOXICAÇÃO POR MONOFLUORACETATO EM OVINOS**

Experimental model to evaluate resistance to the intoxication by monofluoracetate in sheep

Stephanie Carrelo de Lima

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS
2016

Certificado de aprovação (fornecido pela secretaria)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, proteção e disposição para executar todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos por sempre estarem ao meu lado.

A Priscila, pela paciência, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Ricardo Lemos, pelos ensinamentos não só na patologia, mas na vida.

Ao Professor Danilo Gomes, pelas correções e amizade.

A Professora Cássia Rejane Brito Leal, pelas correções e pelo carinho.

Ao Dr. Nilton Marques Carvalho e aos Professores Cláudio Barros e Tessie Beck Martins pela colaboração e correções.

As minhas amigas e companheiras de todos os dias Paula, Rayane e Gleice. Obrigada por me ajudarem neste trabalho e por tornarem os meus dias mais animados. Tenho muita sorte de tê-las comigo.

Aos estagiários Hugo Loro, Amanda Gimelli, Westerlly Jacobson e Carolina Guizelini pela disponibilidade e dedicação.

A Kelly Cristina G. da Silva por desenvolver etapas essenciais neste trabalho, além de ser uma ótima companhia.

A Nickolly, Rubiane e Gerson, pela amizade e pelo trabalho desenvolvido.

“ Nulla tenaci invia est via – Aos persistentes, nenhum
obstáculo é intransponível”

Resumo

LIMA, S. C. Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos. 2016. 26 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Plantas que contêm monofluoracetato (MFA) estão relacionadas a casos de morte súbita em rebanhos da Austrália, África do Sul e Brasil. Diversas medidas de controle são estudadas e envolvem o fornecimento constante de plantas que contêm MFA ou bactérias capazes de degradar este composto. A identificação e seleção de animais resistentes é uma alternativa promissora para a redução de perdas, que pode ser mantida independente do fornecimento contínuo de bactérias ou plantas aos animais. Objetivou-se com este estudo: 1) desenvolver um modelo experimental para identificação de ovinos resistentes à intoxicação por MFA através da mensuração de marcadores não específicos de injúria cardíaca como creatinaquinase fração MB (CK-MB) e aspartato-transaminase (AST) e outros analitos como cálcio ionizado e glicose. 2) estimar a quantidade equivalente de plantas que contêm MFA necessária para atingir as doses de MFA utilizadas neste experimento. Cinco ovinos (G1) receberam doses crescentes não letais de MFA diluído em 10 ml de água deionizada, por via intrarruminal, por seis períodos: 0,05 mg/Kg por 5 dias; 0,08 mg/Kg por 4 dias; 0,08 mg/Kg por 4 dias; 0,1 mg/Kg por 3 dias; 0,1 mg/Kg por 3 dias e 0,25 mg/Kg por 3 dias. Entre cada período houve um intervalo de 10 dias sem a administração. Outros cinco ovinos (G2) receberam apenas 10 ml de água deionizada, também por via intrarruminal, nos mesmos períodos e respeitando os mesmos intervalos que os ovinos do G1. Amostras de sangue foram colhidas no primeiro dia de cada período (imediatamente antes do fornecimento das doses de MFA ou água deionizada) e 48 e 120 horas após a primeira coleta para mensuração dos níveis séricos de CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado. As doses de MFA recebidas pelos animais do presente estudo foram comparadas a quantidade desta substância presente em espécies de *Amorimia* e *Palicourea*. Os ovinos não se demonstraram resistentes à intoxicação. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado entre os grupos G1 e G2, entretanto alguns animais apresentaram hiperglicemia no momento da apresentação dos sinais clínicos. As doses tóxicas de MFA administradas no presente estudo são inferiores à quantidade mínima de folhas necessária para causar intoxicação, considerando-se a quantidade deste princípio presente em cada espécie de planta. Portanto, o princípio quando administrado em sua forma pura, é mais tóxico do que quando ingerido através do consumo de plantas dos gêneros *Amorimia* e *Palicourea*.

Palavras-chave: Monofluoroacetato, marcadores de injúria cardíaca, miocárdio, ovinos.

Abstract

LIMA, S.C. Experimental models to evaluate resistance to the intoxication by monofluoroacetate in sheep. 2016. 26 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Plants containing monofluoroacetate (MFA) are related to sudden death in cattle of Australia, South Africa and Brazil. Several control measures are studied and involved the constant providing of plants containing MFA or bacterias capable of degrading this compound. The identification and selection of resistant animal is a promising alternative to reduce losses, which can be maintained regardless of the continuous supply of bacteria to animals and plants. The aim of this study: 1) develop an experimental model for identification of resistant sheep to intoxication for MFA through the measure of non specific markers of cardiac injury as serum creatine kinase MB (CK-MB) fraction and aspartate transaminase (AST) and others analytes as ionized calcium and glucose. 2) To estimate the equivalent amount of plants containing MFA necessary to achieve MFA doses used in this experiment. Five sheep (G1) received crescent non lethal doses of MFA diluted in 10 ml of deionized water, intraruminal, for six periods: 0,05 mg/kg for 5 days; 0,08 mg/kg for 4 days; 0,08 mg/kg for 4 days; 0,1 mg/kg for 3 days; 0,1 mg/kg for 3 days and 0,25 mg/kg for 3 days. Between each period there was an interval of 10 days without the administration. Others five sheep (G2) received only 10 ml of deionized water, also by intraruminal, at the same periods and respecting the same intervals as the sheeps of G1. Blood samples were collected at the first day of each period (immediately before supply of the doses of MFA or deionized water) and 48 and 120 hours after the first collection for measure of serum levels of CK-MB, AST, glucose and ionized calcium. The doses of MFA received for animals of the current study were compared to the quantity of this substance present in species of *Amorimia* e *Palicourea*. The sheep don't demonstrate to be resistant to intoxication. There was no significant difference in serum levels of CK-MB, AST, glucose and ionized calcium between G1 and G2, however few animals presented hyperglycemia at the moment of the clinical signs presentation. The toxic doses of MFA administered in this study are less than the minimum amount of sheeps required to cause intoxication considering the amount of this principle present in each plant species. Therefore, the principle when administered in its pure form is more toxic than when ingested by consuming plants of *Amorimia* and *Palicourea* genres.

Keywords: Monofluoroacetate, cardiac injury markers, myocardial, sheep.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS	9
ARTIGO – MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A INTOXICAÇÃO POR MONOFLUORACETATO EM OVINOS	15
RESUMO	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	18
REFERÊNCIAS	20
LEGENDA DA FIGURA 1.....	21
QUADRO 1.....	22
QUADRO 2.....	23
FIGURA 1.....	24
INSTRUÇÕES AOS AUTORES: PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA	25

INTRODUÇÃO

O monofluoracetato (MFA) é uma substância altamente tóxica, sintetizada pela primeira vez na Bélgica e posteriormente identificada como princípio tóxico de algumas espécies de plantas (CHENOWETH & GILMAN, 1946; EISLER, 1995). Este composto também é conhecido como fluoracetato, monofluoracetato de sódio, ácido monofluoracético, mão branca e composto 1080 (CLARKE, 1991).

Sua toxicidade ocorre através do bloqueio do Ciclo de Krebs e consequente interrupção da respiração celular e produção de energia das células. Depois de ingerido, o MFA se liga a acetil-CoA formando fluoroacetil-CoA que substitui a acetil-CoA no ciclo. Fluoroacetil-CoA reage com oxaloacetato originando fluorocitrato que é o metabólito responsável pela toxicidade do MFA. Fluorocitrato inibe a enzima aconitase que fisiologicamente faz a conversão de citrato em isocitrato. Desta forma não há produção de NADH e FADH e consequentemente não há conversão de ADP em ATP (GONCHAROV et al., 2005).

Com a interrupção da transformação de citrato em isocitrato este primeiro se acumula nos tecidos e no sangue exercendo papel importante na patogenia desta intoxicação (BUFFA & PETERS, 1949). O citrato tem efeito quelante sobre o cálcio gerando hipocalcemia e a principal consequência deste fato é o risco de arritmias ventriculares (CHENOWETH & GILMAN, 1947).

Animais intoxicados também apresentam aumento dos níveis séricos de glicose devido ao aumento dos níveis de cortisol. Este aumento de cortisol ocorre pela falta de metabolização hepática deste hormônio devido à diminuição da disponibilidade de ATP para os hepatócitos (BALLARD & HYDE, 1967).

Todas as espécies são susceptíveis à intoxicação por MFA, porém demonstram níveis de sensibilidade diferentes. Sabe-se que canídeos são os mais sensíveis, enquanto aves, anfíbios e primatas toleram doses maiores desta substância (CHENOWETH & GILMAN, 1947). Na Tabela 1 estão relacionadas as espécies e as doses letais de MFA para cada uma delas.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais intoxicados ocorrem devido aos efeitos principalmente sobre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema cardíaco e seu início é bastante variável após a ingestão do monofluoracetato. Os sinais de origem neurológica se devem à diminuição da disponibilidade de ATP para os neurônios que resulta em convulsões, ataxia e hiperexcitabilidade (CHENOWETH & GILMAN, 1946). Já no coração, ocorre

insuficiência cardíaca aguda derivada da necrose de cardiomiócitos gerando taquicardia, arritmia e jugular ingurgitada com pulso venoso positivo (PEIXOTO et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2014).

Tabela 1 Doses letais de monofluoracetato para as diferentes espécies.

Espécies	Dose letal (mg/kg por via oral)
Cães	0,06 - 0,20
Bovinos	0,15 - 0,62
Ratos	0,10 - 3,0
Ovinos	0,25 - 0,50
Caprinos	0,30 - 0,70
Gatos	0,30 - 0,50
Suínos	0,30 - 0,40
Cobaíes	0,5 - 1,0
Equinos	0,50 - 1,75
Camundongos	0,50 - 17,0
Coelhos	0,80
Passeriformes	2,50
Galinhas	5,0 - 7,50
Macacos	10,0 - 12,0
Sapos	150,0*
Homem	2,0 - 10,0

* Via subcutânea.

Fonte: Nogueira et al., 2011.

Em 1946, CHENOWETH & GILMAN propuseram um sistema de classificação baseado nos sinais clínicos decorrentes da intoxicação por monofluoracetato apresentados por cada espécie e atualmente NOGUEIRA et al., (2011) complementaram esta classificação (Tabela 2).

Os achados de necropsia variam de acordo com a espécie. Em bovinos e ovinos intoxicados experimentalmente por monofluoracetato as alterações macroscópicas observadas foram semelhantes e caracterizadas por veias e aurículas ingurgitadas, graus variados de dilatação cardíaca e edema pulmonar, hidropericárdio, petéquias no epicárdio e na superfície pleural dos pulmões (PEIXOTO et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2014). Em gatos observou-se edema, congestão e graus variados de hemorragia pulmonar, petéquias e sufusões no endocárdio e pericárdio, dilatação cardíaca direita além de hidropericárdio, degeneração e congestão hepática, gastroenterite catarral, efusão peritoneal, congestão, hemorragias e degeneração renais (COLLICCHIO-ZUANAZE et al., 2010).

As alterações histológicas mais importantes observadas em bovinos e ovinos ocorrem nos rins e são consideradas fundamentais para o diagnóstico da intoxicação, consistindo de

graus variados de degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos uriníferos contornados distais e picnose nuclear.

Tabela 2 Classificação das espécies de acordo com os sinais clínicos apresentados na intoxicação por monofluoracetato.

Categoria	Espécie animal	Ação do monofluoracetato
I	Bovinos, ovinos, caprinos e coelhos	Efeito sobre o coração
II	Gatos, equinos e suínos	Efeito sobre o SNC e coração
III	Cães, cobaios, ratos e hamsters	Efeito sobre o SNC
IV	Outras espécies	Sintomatologia atípica (fraqueza e bradicardia)

Lesões hepáticas como congestão, tumefação, vacuolização e necrose individual de hepatócitos também são encontradas assim como edema pulmonar, porém são consideradas lesões de pouca importância no diagnóstico (PEIXOTO et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2014). Já em gatos, foram descritas lesões microscópicas no miocárdio, pulmões, fígado, rins e encéfalo. No miocárdio observou-se edema, congestão, hemorragia e necrose multifocal; nos pulmões edema, congestão e hemorragia acentuados; congestão com degenerações hidrópica e gordurosa no fígado além de infiltrado mononuclear; nos rins estavam presentes degenerações tubular e hialina; e no encéfalo congestão das substâncias cinzenta e branca, gliose, satelirose e neuronofagia, tumefação celular, cromatólise e múltiplos focos hemorrágicos (COLLICCHIO-ZUANAZE et al., 2010).

Em animais de produção a intoxicação por MFA é descrita apenas experimentalmente, no entanto estas espécies são as mais susceptíveis a intoxicações por plantas que contêm MFA como princípio tóxico. Esta substância foi identificada em várias espécies de plantas associadas a quadros de morte súbita em rebanhos (LEE et al., 2014). Sua identificação nestas plantas é possível através de técnicas de análise como cromatografia em camada delgada, espectroscopia por ressonância magnética nuclear flúor¹⁹ (¹⁹F NMR) e mais recentemente HPLC-APCI-MS (OLIVEIRA, 1963; BARON et al., 1987; LEE et al., 2012). Apesar de algumas espécies de plantas encontradas no Brasil e África do Sul estarem associadas a casos de morte súbita, o MFA não foi identificado como princípio tóxico, o que pode ser explicado por falhas na amostragem, já que muitas vezes as análises são realizadas em plantas cultivadas em herbários por longos períodos (LEE et al., 2012).

Na Austrália, plantas que contêm MFA pertencentes aos gêneros *Gastrolobium* e *Oxylobium* estão amplamente distribuídas pelo país e relacionadas a prejuízos econômicos na pecuária, principalmente devido à intoxicação de bovinos, ovinos, caprinos e equinos (LEE et al., 2014). Na África do Sul, MFA foi identificado em sete espécies de *Dichapetalum* spp.,

entretanto *Dichapetalum cymosum* também conhecida como “gifblaar” é considerada a terceira planta tóxica mais importante da região, responsável por 8% das mortes de bovinos intoxicados por plantas e micotoxinas (KELLERMAN et al., 2005).

No Brasil estima-se que 50% das mortes de bovinos causadas por plantas sejam devido à ingestão de espécies que contêm MFA. Dentre elas destacam-se plantas dos gêneros *Palicourea* e *Amorimia* devido à sua ampla distribuição geográfica. Apesar destas plantas serem consideradas importantes por apresentarem boa palatabilidade (TOKARNIA et al., 2012), na prática seu consumo é atribuído a falta de alimento disponível para os animais. MFA foi identificado em *P. marcgravii*, *P. aeneofusca*, *P. amapaensis*, *P. grandiflora*, *P. aff. juruana*, *P. longiflora*, *P. aff. longiflora*, *P. macarthurorum*, *P. nigricans*, *P. vacillans*, *A. amazonica*, *A. camporum*, *A. exotropa*, *A. pubiflora*, *A. rigida*, *A. septentrionalis* e *Arrabidaea bilabiata*. Apesar de causar quadros de morte súbita, o princípio não foi encontrado em *Pseudocalymma elegans* (LEE et al., 2012; TOKARNIA et al., 2012).

Algumas medidas são indicadas para controlar a quantidade destas plantas presentes nas pastagens, entretanto tornam-se inviáveis em regiões severamente invadidas. As medidas recomendadas para o controle de *Palicourea* spp. são arrancar a planta e depositar herbicida no interior da cova e cercar áreas de mata onde a planta está presente. No caso de *Amorimia* spp. a dificuldade encontra-se no sistema radicular profundo da planta que permite a rebrota após roçadas, queimadas e uso de herbicidas o que poderia predispor às intoxicações já que os brotos são considerados mais tóxicos (TOKARNIA et al., 2012).

O tratamento de animais intoxicados por plantas que contêm MFA é bastante difícil uma vez que esta substância age rapidamente no organismo e na maioria das vezes os animais são encontrados mortos (TOKARNIA et al., 2012). Estudos em cobaias e pequenos animais demonstraram que gluconato de cálcio, tiosulfato de magnésio, etanol, monoacetato de glicerol e acetamida podem agir como antídotos na intoxicação por MFA (HUTCHENS et al., 1949; CHENOWETH et al., 1951; PEREIRA & PEREIRA, 2005; COLLICCHIO-ZUANAZE & SAKATE, 2005; PEIXOTO et al., 2011).

A acetamida foi testada em ovinos e caprinos experimentalmente intoxicados por *Pseudocalymma elegans* e em bovinos intoxicados por *Palicourea. marcgravii* e monofluoracetato no Brasil. Em todos os casos esta substância demonstrou-se eficaz na proteção dos animais quando administrada na dose de 2g/kg, por via oral, ao mesmo tempo ou logo após a ingestão das plantas, entretanto seu efeito não é duradouro (HELAYEL et al., 2011; PEIXOTO et al., 2012). Seu uso é considerado pouco promissor a campo por alguns

fatores como: dificuldade na observação dos sinais clínicos para o tratamento, alto custo e difícil aquisição (PEIXOTO et al., 2012).

Devido às dificuldades encontradas no controle e tratamento das intoxicações por estas plantas, métodos alternativos como a aversão alimentar condicionada estão sendo estudados (BARBOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Os modelos de aversão condicionada se baseiam na administração de cloreto de lítio após a ingestão espontânea da planta pelos animais, que associam o mal estar causado por esta substância ao sabor da planta e passam a evitar seu consumo (RALPHS et al., 2001). Esta técnica reduziu drasticamente ou evitou que ovinos e caprinos consumissem *Palicourea* spp. e *Amorimia* spp. em condições experimentais (BARBOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Apesar dos resultados promissores, a técnica se torna inviável quando se tem uma grande quantidade de animais ou quando há indisponibilidade de alimento. Outro fator que pode contribuir para o insucesso da técnica é a facilitação social, ou seja, a introdução de animais não condicionados no rebanho pode fazer com que os já condicionados passem a consumir a planta novamente (RALPHS, 1997; KIMBALL et al., 2002).

Outra metodologia alternativa é a indução de resistência através da administração de doses não tóxicas de MFA ou de plantas que causam morte súbita. Em ruminantes, acredita-se que o fornecimento de doses não letais de MFA ou de plantas com este princípio tóxico possa auxiliar a proliferação de bactérias que degradam MFA naturalmente presentes no rúmen (CAMBOIM et al., 2012b; DUARTE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos realizados em ratos demonstraram que animais que receberam doses subletais de MFA 4 a 24 horas antes da dose tóxica apresentaram maior resistência à intoxicação (ATZERT, 1971). Casos de resistência adquirida pela ingestão de pequenas doses de plantas que causam morte súbita são naturalmente observados na Austrália. Mamíferos, aves e répteis que habitam regiões onde existem plantas tóxicas que contêm MFA e se alimentam delas, são mais resistentes à intoxicação quando comparados a animais que vivem em áreas livres destas plantas (TWIGG, 1994).

A resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* (DUARTE et al., 2013), *Palicourea aeneofusca* (OLIVEIRA et al., 2013) e *Amorimia pubiflora* (BECKER et al., 2016) foi induzida em caprinos e ovinos através do fornecimento de doses não letais destas plantas. Adicionalmente, verificou-se que a resistência adquirida à *Amorimia septentrionalis* e *Amorimia pubiflora* pode ser transferida a outros animais da mesma espécie através de transfaunação (DUARTE et al., 2013; BECKER et al., 2016). Doses sucessivas não tóxicas de

MFA também foram utilizadas para induzir resistência em ovinos, entretanto os resultados não indicaram resistência dos animais (SANTOS et al., 2014).

Alguns estudos demonstram que a resistência à intoxicação por MFA também pode ser adquirida pela colonização ruminal por bactérias com capacidade de degradar este composto. Estas bactérias produzem enzimas conhecidas como dehalogenases que clivam a ligação carbono-flúor presente no MFA para utilizar o carbono como fonte de energia (CAMBOIM et al., 2012ab). Espécies de *Pseudomonas* sp., *Moraxella* sp., *Burkholderia* sp., *Xanthobacter autotrophicus*, *Sphingobium* sp. e *Sphingomonas* sp. produzem enzimas dehalogenases e são utilizadas no processo de detoxificação ambiental já que a maioria dos compostos halogenados é poluente como inseticidas, fungicidas, herbicidas e solventes (GOLDMAN, 1965; LIU et al., 1998; KURIHARA et al., 2003; FRANKEN et al., 1991; MASAI et al., 2007; NAGATA et al., 1997).

Bactérias com capacidade de produzir estas enzimas também foram isoladas do solo, folhas de plantas e do rúmen de caprinos no Brasil (CAMBOIM et al., 2012ab) e administradas por via oral a animais desta mesma espécie que receberam *Amorimia septentrionalis*. Tanto as bactérias isoladas do rúmen (*Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*) quanto as isoladas do solo e folhas de plantas (*Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp.) foram capazes de prevenir a intoxicação (PESSOA et al., 2015; SILVA et al., 2016), entretanto a manutenção da resistência adquirida só é possível com a contínua ingestão das bactérias (SILVA et al., 2016).

Na Austrália cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* foram modificadas para atividade dehalogenase através da introdução de um gene (plasmídio pBHf). As cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* geneticamente modificadas foram fornecidas a ovinos, e após o estabelecimento desta população bacteriana, os animais receberam doses fracionadas de MFA. Com a dose acumulativa de 0,225 mg/kg, os animais testados apresentaram sinais clínicos leves e se recuperaram, já os ovinos do grupo controle apresentaram sinais clínicos mais acentuados. Com 0,492 mg/kg todos os animais do grupo controle e um animal do grupo tratado morreram. Os demais ovinos do grupo tratado não demonstraram alterações (GREGG et al., 1998).

Outra alternativa promissora é a seleção de animais geneticamente resistentes à intoxicação por MFA. HOWARD et al., (1973) demonstraram que ratos (*Rattus norvegicus*) podem adquirir resistência hereditária ao MFA. Estes autores observaram que na quinta

geração, a dose letal aumentou de 2 mg/kg para 3,5 mg/kg, demonstrando uma maior tolerância.

Um estudo realizado na Nova Zelândia permitiu selecionar rebanhos de bovinos resistentes ao eczema facial através da exposição dos animais a baixas concentrações de esporidesmina. A seleção de animais resistentes foi realizada através do monitoramento de gama glutamiltransferase (GGT) para detecção de lesões hepáticas. Os bovinos que não apresentaram alterações nos padrões enzimáticos foram considerados resistentes. Posteriormente, demonstrou-se que a resistência era de origem genética e estes animais foram selecionados para reprodução (MORRIS et al., 1991).

No caso de animais intoxicados por MFA, a existência de ovinos naturalmente resistentes à intoxicação já foi demonstrada experimentalmente. Em um estudo visando induzir resistência a intoxicação através do fornecimento de doses não letais de MFA, não ocorreu resistência com as doses utilizadas, porém tanto ovinos do grupo tratado quanto do grupo controle sobreviveram ao desafio com uma dose letal deste princípio tóxico (1 mg/kg) (SANTOS et al., 2014).

Uma metodologia semelhante poderia ser utilizada associando a mensuração de enzimas que podem indicar lesão cardíaca à resistência dos animais. A troponina I cardíaca (cTnI) é um importante marcador de lesão miocárdica validado na identificação de lesões cardíacas isquêmicas em ovinos (LEONARDI et al., 2008) e bovinos (VARGA et al., 2009). Já o peptídeo natriurético NT-ProBNP, eficiente marcador de hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca congestiva foi utilizado em ovinos para detectar sobrecarga cardíaca (PEMBERTON et al., 1998).

Outros marcadores como aspartato-transaminase (AST), creatina quinase (CK), associada à dosagem de creatinaquinase fração MB (CK-MB) também são utilizados como biomarcadores de lesão em cardiomiócitos em animais domésticos, entretanto são considerados não específicos.

Parâmetros como cálcio ionizado e glicose também podem estar alterados nos casos de intoxicação por MFA, levando-se em consideração o mecanismo de ação desta substância. A diminuição do cálcio sérico total e o aumento de glicose são considerados inversamente proporcionais à quantidade de citrato no organismo (BOSAKOWSKI & LEVIN, 1986).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi: 1) desenvolver um modelo experimental para identificação de ovinos resistentes à intoxicação por MFA através da mensuração de marcadores não específicos de injúria cardíaca e outros analitos como cálcio ionizado e

glicose. 2) estimar a quantidade equivalente de plantas que contêm MFA necessária para atingir as doses de MFA utilizadas neste experimento.

REFERÊNCIAS

- ATZERT, S. P. A review of sodium monofluoroacetate (Compound 1080), its properties, toxicology, and use in predator and rodent control. **Special Scientific Report – Wildlife**, n. 146, 34 p, 1971.
- BALLARD, C. L.; HYDE, P. M. Effect of insulin on blood glucose and corticosterone levels in sodium fluoroacetate induced diabetes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124 (1), p. 317-320, 1967.
- BARBOSA, R.R., SILVA, I.P., SOTO-BLANCO, B. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28 (12), p. 571-574, 2008.
- BARON, M. L., BOTHROYD, C.M., ROGERS, G.R., STAFFA, A., RAE, I.D. Detection and measurement of fluoroacetate in plant extracts by ¹⁹F-NMR. **Phytochemistry**, v. 26. n. 8, p. 2293-2295, 1987.
- BECKER, M., CARNEIRO, F.M., OLIVEIRA, L. P., SILVA, M.I.V., RIET-CORREA, F., LEE, S.T., PESCADOR, C.A., NAKASATO, L., COLODEL, E.M. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia pubiflora* in sheep with non-toxic doses of the plant and ruminal content. **Ciência rural**. v. 46, n.4, p. 674-680, 2016.
- BOSAKOWSKI T. & LEVIN A.A. Serum citrate as a peripheral indicator of fluoroacetate and fluorocitrate toxicity in rats and dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 85, p. 428-436, 1986.
- BUFFA, P.; PETERS, R. A. Formation of citrate *in vivo* induced by fluoroacetate poisoning. **Nature**, v. 163, p. 914, 1949.
- CAMBOIM E.K.A., TADRA-SFEIR M.Z., SOUZA E.M., PEDROSA F.O., ANDRADE P. P., MCSWEENEY C.S., RIET-CORREA F. & MELO M.A. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. **Scientific World Journal**, 2012:149893, 2012a.
- CAMBOIM E.K.A., ALMEIDA A.P., TADRA-SFEIR M.Z., JUNIOR F.G., ANDRADE P.P., MCSWEENEY C.S., RIET-CORREA F. & MELO M.A. Isolation of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. **Scientific World Journal** 2012:178254, 2012b.
- CHENOWETH, M.B.; GILMAN, A. Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species responses to fluoroacetate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 87, 90-103, 1946.
- CHENOWETH, M. B.; GILLMAN, A. Studies on the pharmacology of fluoroacetate II. Action on the heart. The Bulletin of the U. S. **Army Medical Department**, v. 7, p. 687-699, 1947.

CHENOWETH, M. B., KANDEL, A., JOHNSON, L.B., BENNET D.R. Factors influencing fluoroacetate poisoning- practical treatment with glycerol monoacetate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 102, p. 31-49, 1951.

CLARKE D.D. Fluoroacetate and fluorocitrate: Mechanism of action. **Neurochemical Research**, v.16, n.9, p.1055-1058, 1991.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R.C., SAKATE, M. Aspectos clínicos e terapêuticos da intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais domésticos: revisão. **Veterinária Notícias**. v11(2), p 81-89, 2005.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R.C. SAKATE, M. LANGRAFE, L., TAKAHIRA, R.K., BURINI, C. Hematological and biochemical profiles and histopathological evaluation of experimental intoxication by sodium fluoroacetate in cats. **Human & experimental toxicology**. v.29, n.11, p. 903-13, 2010.

DUARTE A.L.L., MEDEIROS R.M.T., CARVALHO F.K.L., LEE S.T., COOK D., PFISTER J.A., COSTA V.M.M. & RIET-CORREA F. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (Mascagnia) *septentrionalis* in goats. **Journal of Applied Toxicology**. v. 34(2), p. 220-223, 2013.

EISLER, R. Sodium monofluoroacetate (1080) hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. Patuxent Environmental Science Center, U.S. National Biological Service. **Biological Report**, 52 p, 1995.

FRANKEN, S.M.; ROZEBOOM H.J.; KALK K.H.; DIJKSTRA B.W. Crystal structure of haloalkane dehalogenase - an enzyme to detoxify halogenated alkanes. **The EMBO Journal**, v.10, n. 6, p. 1297-1302, 1991.

GOLDMAN, P. The enzymatic cleavage of the carbon-fluorine bond in fluoroacetate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 8, p. 3434–3438, 1965.

GONCHAROV, N. V.; JENKINS, R. O.; RADILOV, A. S. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 148-161, 2005.

GREGG K., HAMDORF B., HENDERSON K., KOPECNY J. & WONG C. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64(9), p. 3496–3498, 1998.

HELAYEL, M.A., CALDAS, S.A., PEIXOTO, T.C., FRANÇA, T.N., TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J. O antagonismo com acetamida em experimentos com ovinos, caprinos e coelhos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Pseudocalymma elegans* Bignoniaceae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31(10), p. 867-74, 2011.

HOWARD, W. E.; MARSH, R. E.; PALMATEER, S. D. Selective breeding of rats for resistance to sodium monofluoroacetate. **Journal of Applied Ecology**, v. 10, p. 731, 1973.

HUTCHENS JO, WAGNER H, PODOLSKY, B. MCMAHON, M.T. The effect of ethanol and various metabolites on fluoroacetate poisoning. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 95(1),p. 62-70, 1949 .

KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A.W.; NAUDE, T. W.; BOTHA, C. J. Cardiovascular system. In *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*, 2nd ed.; Oxford University Press: Cape Town, South Africa,p 146–153, 2005.

KIMBALL B.A., PROVENZA F.D. & BURRITT E.A. Importance of alternative foods on the persistence of flavor aversions: implications for applied flavor avoidance learning. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 76, p.249-258, 2002.

KURIHARA, T.; YAMAUCHI, T.; ICHIYAMA, S.; TAKAHATA, H.; ESAKI, N. Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 23, n. 3, p. 347-355, 2003.

LEE S.T., COOK D., RIET-CORREA F., PFISTER J.A., ANDERSON W.R., LIMA F.G. & GARDNER D. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon**. v. 60, p.791-796, 2012.

LEE, S. T., COOK, D., PFISTER, J. A., ALLEN, J. G., COLEGATE, S. M., RIET-CORREA, F. & TAYLOR, C. M. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 7345-7354, 2014.

LEONARDI, F.; PASSERI, B.; FUSARI, A.; DE RAZZA, P.; BEGHI, C.; LORUSSO, R.; CORRADI, A.; BOTTI, P. Cardiac troponin I (cTnI) concentrati (2008): Cardiac troponin I (cTnI) concentration in ovine model of n in ovine model of myocardial ischemia. **Research in Veterinary Science**. v. 85, p. 141-144, 2008..

LIU, J.Q; KURIHARA, T., ICHIYAMA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; KAWASAKI, H.; SODA, K.; ESAKI, N. Reaction Mechanism of Fluoroacetate Dehalogenase from *Moraxella* sp. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 47, p. 30897–30902, 1998.

MASAI E.; KATAYAMA Y.; FUKUDA M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n.1, p. 1-15, 2007.

MORRIS, C.A., TOWERS, N.R., TEMPERO, H.J. Breeding for resistance to facial eczema in dairy cattle. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**. v. 53, p. 221-224, 1991.

NAGATA, Y.; MIYAUCHI, K.; DAMBORSKY, J.; MANOVA, K.; ANSORGOVA, A.; TAKAGI, M. Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a g-hexachlorocyclohexane- degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3707–3710, 1997.

NOGUEIRA, V.A., PEIXOTO, T.C., FRANÇA, T.N., CALDAS, S.A., PEIXOTO, P.V. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 10, p. 823-838, 2011.

OLIVEIRA, M. M. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Experientia**, v. 19, p. 586, 1963.

OLIVEIRA, M.D., RIET-CORREA, F., CARVALHO, F.K.L., SILVA, G.B., PEREIRA, W.S. & MEDEIROS, R. M.T. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33(6), p.731-734, 2013.

OLIVEIRA, M.D., RIET-CORREA, F., SILVA, G.B., PEREIRA, W.S., FREIRE, L.F.S., MEDEIROS, R.M.T. Aversão alimentar condicionada para o controle da intoxicação por *Palicourea aeneofusca*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1246-1248, 2014.

PEIXOTO, T.C., NOGUEIRA, V.A., CALDAS, S.A., FRANÇA, T.N., ANJOS, B.L., ARAGÃO, A.P. & PEIXOTO, P.V. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.4, p. 219-328, 2012.

PEIXOTO T.C., NOGUEIRA V.A., COELHO C.D., VEIGA C.C.P., PEIXOTO P.V. & BRITO M.F. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 12, p.1021-1030, 2010.

PEIXOTO, T.C., OLIVEIRA, L.I., CALDAS, S.A., CATUNDA JUNIOR, F.E.A., CARVALHO, M.G., FRANÇA, T.N. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31(11), p. 938-52, 2011.

PEMBERTON, C.J.; YANDLE, T.G.; RADEMAKER, M.T.; CHARLES, C. J.; AITKEN, G.D.; ESPINER, E. A. Amino-terminal proBNP in ovine plasma: evidence for enhanced secretion in response to cardiac overload. **The American Physiological Society**. v. 275, p. 1200–1208, 1998.

PEREIRA, N. A, PEREIRA, S. M.N. Contribuição ao estudo de plantas tóxicas e seus antagonistas: erva-de-rato, a Rubiaceae, *Paulicourea Marcgravii* St. Hill. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.86, p. 109-111, 2005.

PESSOA, D.A.N., SILVA, L.C.A., LOPES, J.R.G., MACÊDO, M.M.S., GARINO JUNIOR, F., AZEVEDO, S.S. & RIET-CORREA, F. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p.115-128, 2015.

RALPHS M.H. Long term retention of aversions to tall larkspur in naive and native cattle. **Journal of Range Management**. v. 50, p. 367-370, 1997.

RALPHS M.H. **Plant toxicants and livestock: prevention and management.** In: Hui Y.H., Smith R.A. & Spoerke Jr D.G. (Ed.), *Foodborne Disease Handbook*. 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, p.441-470, 2001.

SANTOS A.C., RIET-CORREA F., HECKLER R.F., LIMA S.C., SILVA M.L., REZENDE R., CARVALHO N.M. & LEMOS R.A.A. Administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34(7), p. 649-654, 2014.

SILVA, L.C.A, PESSOA, D.A.N, LOPES, J.R.G., ALBUQUERQUE, L.G., SILVA, L.S.A., GARINO JÚNIOR, F., RIET-CORREA, F. Protection against, *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoracetate-degrading bactéria. **Toxicon**. v. 111, p. 65-68, 2016.

TOKARNIA C.H., BRITO M.F., BARBOSA J.D., PEIXOTO P.V. & DÖBEREINER J. **Plantas tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p, 2012.

TWIGG, L. E. Occurrence of fluoroacetate in Australian plants and tolerance to 1080 in indigenous Australian animals. **The Royal Society of New Zealand Miscellaneous**, v. 28, p. 97- 115, 1994.

VARGA, A.; SCHOBBER, K.E.; WALKER, W.L; LAKRITZ, J.; MICHAEL RINGS D. Validation of a Commercially Available Immunoassay for the Measurement of Bovine Cardiac Troponin I. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 23 p. 359–365, 2009.

ARTIGO**MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À
INTOXICAÇÃO POR MONOFLUORACETATO EM OVINOS**

Stephanie C. Lima , Kelly Cristina S. Godoy, Rayane C. Pupin, Paula V. Leal, Nilton M. Carvalho, Alda I. Souza,
Danilo C. Gomes & Ricardo A.A. Lemos

Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos¹

Stephanie C. Lima², Kelly Cristina S. Godoy³, Rayane C. Pupin², Paula V. Leal², Nilton M. Carvalho⁴, Alda I. Souza⁴, Danilo C. Gomes⁴ & Ricardo A.A. Lemos⁴

ABSTRACT.- Lima S.C., Godoy K.C.S., Pupin R.C., Leal P.V., Carvalho N.M., Souza A.I., Gomes D.C. & Lemos R.A.A. 2016. [Experimental models to evaluate resistance to the intoxication by monofluoracetate in sheep.] Modelo experimental para avaliação da resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil. E-mail: lap.famez@ufms.br

Plants containing monofluoracetate (MFA) are related to sudden death in cattle of Australia, South Africa and Brazil. Several control measures are studied and involved the constant providing of plants containing MFA or bacterias capable of degrading this compound. The identification and selection of resistant animal is a promising alternative to reduce losses, which can be maintained regardless of the continuous supply of bacteria to animals and plants. The aim of this study: 1) develop an experimental model for identification of resistant sheep to intoxication for MFA through the measure of non specific markers of cardiac injury as serum creatine kinase MB (CK-MB) fraction and aspartate transaminase (AST) and others analytes as ionized calcium and glucose. 2) To estimate the equivalent amount of plants containing MFA necessary to achieve MFA doses used in this experiment. Five sheep (G1) received crescent non lethal doses of MFA diluted in 10 ml of deionized water, intraruminal, for six periods: 0,05 mg/kg for 5 days; 0,08 mg/kg for 4 days; 0,08 mg/kg for 4 days; 0,1 mg/kg for 3 days; 0,1 mg/kg for 3 days and 0,25 mg/kg for 3 days. Between each period there was an interval of 10 days without the administration. Others five sheep (G2) received only 10 ml of deionized water, also by intraruminal, at the same periods and respecting the same intervals as the sheeps of G1. Blood samples were collected at the first day of each period (immediately before supply of the doses of MFA or deionized water) and 48 and 120 hours after the first collection for measure of serum levels of CK-MB, AST, glucose and ionized calcium. The doses of MFA received for animals of the current study were compared to the quantity of this substance present in species of *Amorimia* e *Palicourea*. The sheep don't demonstrate to be resistant to intoxication. There was no significant difference in serum levels of CK-MB, AST, glucose and ionized calcium between G1 and G2, however few animals presented hyperglycemia at the moment of the clinical signs presentation. The toxic doses of MFA administered in this study are less than the minimum amount of sheets required to cause intoxication considering the amount of this principle present in each plant species. Therefore, the principle when administered in its pure form is more toxic than when ingested by consuming plants of *Amorimia* and *Palicourea* genres.

INDEX TERMS.- Monofluoroacetate, cardiac injury markers, myocardial, sheep.

RESUMO.- Plantas que contêm monofluoracetato (MFA) estão relacionadas a casos de morte súbita em rebanhos da Austrália, África do Sul e Brasil. Diversas medidas de controle são estudadas e envolvem o fornecimento constante de plantas que contêm MFA ou bactérias capazes de degradar este composto. A identificação e seleção de animais resistentes é uma alternativa promissora para a redução de perdas, que pode ser mantida independente do fornecimento contínuo de bactérias ou plantas aos animais. Objetivou-se com este estudo: 1) desenvolver um modelo experimental para identificação de ovinos resistentes à

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em...

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

⁴ FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS. * Autor para correspondência: lap.famez@ufms.br

intoxicação por MFA através da mensuração de marcadores não específicos de injúria cardíaca como creatinaquinase fração MB (CK-MB) e aspartato-transaminase (AST) e outros analitos como cálcio ionizado e glicose. 2) estimar a quantidade equivalente de plantas que contêm MFA necessária para atingir as doses de MFA utilizadas neste experimento. Cinco ovinos (G1) receberam doses crescentes não letais de MFA diluído em 10 ml de água deionizada, por via intrarruminal, por seis períodos: 0,05 mg/Kg por 5 dias; 0,08 mg/Kg por 4 dias; 0,08 mg/Kg por 4 dias; 0,1 mg/Kg por 3 dias; 0,1 mg/Kg por 3 dias e 0,25 mg/Kg por 3 dias. Entre cada período houve um intervalo de 10 dias sem a administração. Outros cinco ovinos (G2) receberam apenas 10 ml de água deionizada, também por via intrarruminal, nos mesmos períodos e respeitando os mesmos intervalos que os ovinos do G1. Amostras de sangue foram colhidas no primeiro dia de cada período (imediatamente antes do fornecimento das doses de MFA ou água deionizada) e 48 e 120 horas após a primeira coleta para mensuração dos níveis séricos de CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado. As doses de MFA recebidas pelos animais do presente estudo foram comparadas a quantidade desta substância presente em espécies de *Amorimia* e *Palicourea*. Os ovinos não se demonstraram resistentes à intoxicação. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado entre os grupos G1 e G2, entretanto alguns animais apresentaram hiperglicemia no momento da apresentação dos sinais clínicos. As doses tóxicas de MFA administradas no presente estudo são inferiores à quantidade mínima de folhas necessária para causar intoxicação, considerando-se a quantidade deste princípio presente em cada espécie de planta. Portanto, o princípio quando administrado em sua forma pura, é mais tóxico do que quando ingerido através do consumo de plantas dos gêneros *Amorimia* e *Palicourea*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO.- Monofluoroacetato, marcadores de injúria cardíaca, miocárdio, ovinos.

INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas que causam morte súbita são encontradas principalmente em países como Austrália, África do Sul e Brasil ocasionando prejuízos econômicos (Lee et al. 2014). A toxicidade destas plantas se deve à presença de monofluoroacetato (MFA), substância altamente tóxica que bloqueia o Ciclo de Krebs prejudicando a respiração celular e a produção de energia (Krebs et al. 1994, Lee et al. 2012).

No Brasil, quadros de morte súbita são causados por várias espécies de plantas, entretanto as pertencentes aos gêneros *Palicourea* e *Amorimia* destacam-se por apresentarem ampla distribuição geográfica (Lee et al. 2012, Tokarnia et al. 2012).

Devido às dificuldades encontradas no controle e tratamento das intoxicações por estas plantas, metodologias alternativas como aversão alimentar condicionada e indução de resistência estão sendo estudados (Barbosa et al. 2008, Oliveira et al. 2014).

Os modelos de aversão condicionada se baseiam na administração de cloreto de lítio após a ingestão espontânea da planta pelos animais, que associam o mal estar causado por esta substância ao sabor da planta e passam a evitar seu consumo (Ralphs et al. 2001). Esta técnica reduziu drasticamente ou evitou que ovinos e caprinos consumissem *Palicourea* spp. e *Amorimia* spp. em condições experimentais (Barbosa et al. 2008, Oliveira et al. 2014). Apesar dos resultados promissores, a técnica se torna inviável quando se tem uma grande quantidade de animais ou quando há indisponibilidade de alimento. Outro fator que pode contribuir para o insucesso da técnica é a facilitação social, ou seja, a introdução de animais não condicionados no rebanho pode fazer com que os já condicionados passem a consumir a planta novamente (Ralphs, 1997, Kimball et al. 2002).

A inoculação intrarruminal de bactérias com capacidade de degradar MFA isoladas do rúmen de caprinos (*Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*) e do solo e das folhas de plantas que contêm MFA (*Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp.) foi capaz de induzir resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis*, porém a manutenção da resistência adquirida só é possível com a contínua ingestão das bactérias (Pessoa et al. 2015; Silva et al. 2016). Resultados positivos também foram obtidos através do fornecimento de doses crescentes não tóxicas de *Palicourea* sp. e *Amorimia* sp., entretanto, nestes casos não se sabe a duração da resistência adquirida (Duarte et al. 2013; Oliveira et al. 2013, Becker et al. 2016).

Por outro lado, a tentativa de indução de resistência com doses não letais de MFA não obteve sucesso (Santos et al. 2014). Apesar disso, este estudo demonstrou a existência de animais naturalmente resistentes à intoxicação por esta substância. A identificação e seleção de animais resistentes é uma alternativa promissora para a redução de perdas que pode ser mantida independente do fornecimento contínuo de bactérias ou plantas aos animais.

Um estudo realizado na Nova Zelândia permitiu selecionar rebanhos de bovinos resistentes ao eczema facial através da exposição dos animais a baixas concentrações de esporidesmina. A seleção de

animais resistentes foi realizada através do monitoramento de gama glutamiltransferase (GGT) para detecção da lesão hepática. Os bovinos que não apresentaram alterações nos padrões enzimáticos foram considerados resistentes (Morris et al., 1991). Uma metodologia semelhante poderia ser utilizada associando a mensuração de enzimas que podem indicar lesão cardíaca à resistência dos animais.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi: 1) desenvolver um modelo experimental para identificação de ovinos resistentes à intoxicação por MFA através da mensuração de marcadores não específicos de injúria cardíaca como aspartato-transaminase (AST) e creatinaquinase fração MB (CK-MB) e outros analitos como cálcio ionizado e glicose. 2) estimar a quantidade equivalente de plantas que contêm MFA necessária para atingir as doses de MFA utilizadas neste experimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 ovinos (oito machos e duas fêmeas), clinicamente sadios, sem raça definida, com 24 meses de idade e pesos entre 30-50 kg, sem contato prévio com qualquer fonte de MFA. Todos foram mantidos em baias individuais, alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*), suplementação concentrada, sal mineral e água à vontade. A metodologia utilizada neste experimento foi adaptada de Santos et al. (2014).

O Grupo 1 (G1) foi constituído por cinco ovinos (1, 2, 3, 4, 5) que receberam doses crescentes não letais de MFA (Sigma-AldrichCo.) diluído em 10 mL de água deionizada, através de cânula ruminal, por seis períodos: 0,05 mg/kg por 5 dias (período 1); 0,08 mg/kg por 4 dias (período 2); 0,08 mg/kg por 4 dias (período 3); 0,1 mg/kg por 3 dias (período 4); 0,1 mg/kg por 3 dias (período 5); 0,25 mg/kg por 3 dias (período 6). Entre cada período houve um intervalo de 10 dias sem a administração, visando minimizar o efeito acumulativo do MFA.

O Grupo 2 (G2) foi composto por outros cinco ovinos (6, 7, 8, 9, 10) que receberam apenas 10 mL de água deionizada, também através de cânula ruminal, nos mesmos períodos e respeitando os mesmos intervalos que os ovinos do G1.

Alíquotas de 5 ml de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, acondicionadas em tubos sem anticoagulante até a formação de coágulo, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em tubo plástico tipo Eppendorf® a -80°C até o momento da avaliação. Estas coletas foram realizadas no primeiro dia de cada período (imediatamente antes do fornecimento das doses de MFA ou água deionizada) e 48 e 120 horas após a primeira coleta. Nos intervalos entre os períodos não foram colhidas amostras de sangue.

As dosagens das atividades séricas das enzimas aspartato transaminase (AST) e creatina quinase fração MB (CK-MB) foram utilizados como marcadores de lesão cardíaca, enquanto os níveis de glicose e cálcio ionizado foram utilizados para detecção dos efeitos indiretos do MFA no organismo. Os ensaios bioquímicos, realizados por método enzimático, seguiram os protocolos disponibilizados nos kits comerciais (Roche®, Jaguaré, São Paulo, Brasil), com leitura em analisador bioquímico automático (cobas c 111).

No início de cada período era realizado exame físico para avaliação da frequência cardíaca, peso e comportamento. No dia seguinte ao fim de cada período, apenas frequência cardíaca e comportamento eram avaliados. Os animais eram observados a cada seis horas e as observações intensificadas quando havia manifestação de sinais clínicos.

Todos os ovinos que apresentaram sinais clínicos brandos foram mantidos em repouso até total recuperação. Quando os sinais clínicos eram mais graves, os animais eram tratados com 2 g/kg de acetamida, diluída em água e administrada pela cânula ruminal.

Nos casos com evolução fatal realizou-se a necropsia com coleta de fragmentos dos diversos órgãos em formol tamponado 10% que foram processados rotineiramente para exame histopatológico. O coração de cada animal foi seccionado transversalmente em cinco secções equidistantes (C1, C2, C3, C4 e C5) para avaliação do miocárdio e fragmentos de ventrículo esquerdo e direito, septo interventricular, músculo papilar direito e esquerdo foram coletados.

Para fins de comparação entre as doses de MFA recebidas pelos animais do presente estudo e a quantidade desta substância presente em espécies de *Amorimia* e *Palicourea*, elaborou-se um quadro contendo as doses de princípio tóxico identificadas nestas plantas. As doses selecionadas para composição do quadro foram retiradas de artigos que utilizaram a mesma metodologia para determinação do princípio tóxico e relataram intoxicação espontânea ou reproduziram intoxicação experimental.

Os níveis séricos das enzimas AST e CK-MB, assim como os níveis de glicose e cálcio ionizado foram comparados entre os grupos G1 e G2 através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, adotando-se o nível de significância de 5%.

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS e protocolado sob o nº 706/2015.

RESULTADOS

No período 1, os ovinos do G1 receberam uma dose total de 0,25 mg/kg e não apresentaram quaisquer sinais clínicos de intoxicação por MFA. Os primeiros sinais clínicos de intoxicação foram observados no ovino 1 e ocorreram no segundo período, após o recebimento de 4 doses consecutivas de 0,08 mg/kg (dose total de 0,32 mg/kg).

No período 3, os ovinos 1 e 2 se intoxicaram após receberem uma dose total de 0,32 mg/kg. Todos os ovinos que adoeceram nos períodos 2 e 3 se recuperaram espontaneamente.

O primeiro caso de intoxicação fatal ocorreu no período 4, após o recebimento de uma dose total de 0,3 mg/kg. O ovino 1 foi encontrado morto sem apresentar sinais clínicos prévios. Nesse mesmo período, o ovino 3 apresentou sinais clínicos graves de intoxicação e recuperou-se 24 horas após o tratamento com acetamida.

No período 5, mesmo após o recebimento de uma dose total de 0,3 mg/kg, nenhum dos animais se intoxicou. No período 6, dois animais (ovinos 4 e 5) que não haviam apresentado sinais clínicos durante o experimento, foram encontrados mortos sem apresentação de sinais clínicos prévios depois de receberem uma dose de 0,25 mg/kg de MFA. Já os ovinos 2 e 3 demonstraram sinais graves de intoxicação após receberem duas doses consecutivas de 0,25 mg/kg. Ambos recuperaram-se 32 e 18 horas, respectivamente, após o tratamento com acetamida. Os ovinos do G2 não apresentaram qualquer alteração na frequência cardíaca ou comportamento durante o experimento. Os sinais clínicos, dose ingerida, frequência cardíaca no início dos períodos e durante a apresentação dos sinais clínicos e desfecho dos ovinos do G1 durante o período experimental estão resumidos no Quadro 1.

Não houve diferença significativa nos níveis séricos de CK-MB, AST, glicose e cálcio ionizado entre os grupos G1 e G2. No entanto, em quatro ocasiões, os níveis séricos de glicose estavam acima do valor de referência para a espécie ovina. No período 2, os ovinos 1 e 2 apresentaram valores de 115,27 e 85,42 mg/dL, respectivamente. Já o ovino 3, apresentou hiperglicemia nos períodos 3 (152,60 mg/dL) e 4 (221,63 mg/dL). Em todos os casos este aumento ocorreu durante a apresentação dos sinais clínicos. Os valores médios de aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase fração MB (CKMB), glicose e cálcio ionizado dos ovinos dos grupos 1 e 2 encontram-se na Fig.1.

Os principais achados de necropsia nos três animais (Ovinos 1, 4 e 5) foram mucosa oral cianótica, edema e congestão pulmonares, hidropericárdio leve a moderado, discretas petéquias multifocais no epicárdio, veias jugulares, pulmonares, cava caudal e cranial moderadamente ingurgitadas, coágulo no ventrículo esquerdo e fígado discretamente aumentado com padrão lobular evidente. Os rins do Ovino 1 estavam discretamente pálidos e na superfície subcapsular próximo ao polo caudal do rim esquerdo havia poucas petéquias. Já os rins do Ovino 4 estavam difusamente pálidos e do Ovino 5 difusamente avermelhados. Nos Ovinos 1 e 5 a porção inicial do duodeno apresentava mucosas difusamente avermelhadas. Não foram observadas alterações macroscópicas no miocárdio destes animais.

As lesões histológicas foram semelhantes em todos os animais variando apenas na intensidade e consistiram principalmente de grupos aleatórios de cardiomiócitos com citoplasma fortemente eosinofílico, por vezes sem estriações, núcleo picnótico e vacuolizado. Adicionalmente havia áreas discretas e aleatórias de edema, fibrose e infiltrado inflamatório linfocítico não associado às lesões, congestão e edema pulmonares discretos e discreta congestão hepática (Ovinos 1 e 4). Os demais órgãos não apresentaram alterações.

O Quadro 2 apresenta uma comparação entre as doses de MFA recebidas pelos animais do presente estudo e a quantidade desta substância presente em espécies de *Amorimia* e *Palicourea*

DISCUSSÃO

O modelo experimental adotado reproduziu a intoxicação por MFA em ovinos, porém a metodologia empregada não foi eficiente para identificar ovinos resistentes. Os sinais clínicos apresentados pelos ovinos foram característicos de intoxicação por MFA (Peixoto et al. 2010, Santos et al. 2014). Apesar da recuperação dos animais que receberam acetamida, não se pode afirmar que a mesma funcionou como antídoto, já que quando mantidos em repouso os animais podem se recuperar espontaneamente. Peixoto et al. (2012) demonstraram seu efeito protetor em bovinos que receberam MFA, porém neste caso a acetamida foi fornecida juntamente com este composto.

Neste estudo não foram observadas lesões macroscópicas no coração dos ovinos, o que também é relatado por outros autores (Nogueira et al. 2010, Peixoto et al. 2010). Em bovinos naturalmente intoxicados por *Amorimia exotropa*, áreas focais, arredondadas, bem delimitadas, de coloração branca a avermelhada foram vistas principalmente no músculo papilar esquerdo. Estas áreas correspondiam à necrose de cardiomiócitos ou proliferação de tecido conjuntivo fibroso imaturo (Bandinelli et al. 2014).

As áreas discretas de fibrose no miocárdio são indicativas de ocorrência de lesões crônicas, entretanto não podem ser consideradas como a causa da morte dos animais, já que em nenhum deles foram observados sinais clínicos compatíveis com lesões crônicas. Assim, as mortes podem ser atribuídas ao efeito acumulativo do MFA. Até o momento não há descrições de alterações cardíacas crônicas em animais que ingerem MFA ou plantas do gênero *Palicourea* em pequenas doses por períodos prolongados (Santos et al. 2014, Barbosa et al. 2015). Em contraste, casos de fibrose cardíaca são descritos em intoxicações por plantas do gênero *Amorimia* (Schons et al. 2011, Soares et al. 2011, Albuquerque et al. 2014). Isto pode ser explicado pela menor concentração de MFA presente nas espécies de *Amorimia* (Lee et al. 2012), que proporcionaria uma possibilidade de ingestão de pequenas doses, o que não ocorre em casos de intoxicação por MFA ou *Palicourea* sp.

Apesar de serem identificadas áreas aleatórias de necrose de cardiomiócitos no exame histopatológico, estas lesões não elevaram os níveis séricos de CK-MB e AST. Isto pode estar relacionado ao fato das lesões serem leves ou até mesmo à especificidade do kit utilizado, já que este é preconizado para uso em humanos e ainda não foi padronizado para uso em ovinos. Resultado semelhante foi observado em um estudo de intoxicação experimental por sementes de *Senna occidentalis*, em que lesões miocárdicas leves foram detectadas no exame histopatológico, porém não houve alterações nos níveis séricos de CK-MB e AST (Lopes et al. 2016).

Em outras espécies animais, a mensuração desta isoenzima utilizando kits humanos é aplicada na detecção de cardiomiopatias principalmente em cães (Fredericks et al. 2001, Diniz et al. 2007), porém já foi utilizada experimentalmente para detecção de possíveis lesões cardíacas causadas pela intoxicação por *Amorimia rigida* em camundongos (Melo et al. 2008) e coelhos (Borboleta et al. 2011) e em gatos intoxicados por MFA (Collichio-Zuannaze, 2006).

Alterações nos níveis de glicose e cálcio ionizado seriam esperadas considerando-se o mecanismo de ação do MFA, entretanto os níveis de cálcio ionizado se mantiveram normais durante o período experimental, enquanto os níveis de glicose aumentaram em alguns animais somente durante a apresentação dos sinais clínicos. Bosakowski & Levin (1986), descrevem a diminuição do cálcio sérico total em cães, porém em ratos esta alteração não foi observada. Estes autores ainda mencionam aumento da glicemia nestas duas espécies e apontam uma relação inversamente proporcional entre a diminuição do cálcio total e aumento na glicemia e os níveis de citrato sérico.

No presente estudo nenhum dos ovinos foi resistente à intoxicação por MFA quando receberam doses de 0,25-0,5 mg/kg, diferindo do observado por Santos et al. (2014) que relatam a existência de ovinos resistentes à dose de 1 mg/kg de MFA. Destaca-se que a metodologia utilizada nos dois experimentos foi semelhante, entretanto no presente estudo houve um intervalo de 10 dias entre cada período, enquanto que no estudo de Santos et al. (2014), os intervalos foram de 10 dias entre os períodos, até o período 3. A partir do período 3 o intervalo passou a ser de 15 dias. A maior sensibilidade à intoxicação observada neste experimento não pode ser atribuída ao efeito acumulativo do MFA, pois os primeiros sinais clínicos de intoxicação ocorreram no período 2, quando o intervalo entre os períodos era o mesmo utilizado por Santos et al. (2014). Outro fato que reforça a ausência do efeito acumulativo é a ausência de sinais de intoxicação no quinto período, mesmo após a apresentação de sinais clínicos pelo ovino 3 e a morte do ovino 1. Apesar destas diferenças, todos os ovinos que se intoxicaram ingeriram doses mínimas consideradas como letais (Humphreys, 1988). A ampla variação nas doses letais do MFA em ovinos é descrita (Humphreys, 1988), no entanto em nenhum dos relatos anteriores encontramos menção a existência de diferenças na sensibilidade em um mesmo animal, fato observado no ovino que se intoxicou no período 4 e não se intoxicou no período seguinte. A ocorrência de intoxicação por MFA foi descrita em ovinos que também apresentavam deficiência de vitamina E e Selênio. Considerando o papel antioxidante destas substâncias, os autores consideram que sua deficiência possa potencializar o efeito do MFA (Giannitti et al. 2013).

Estes resultados não confirmam a hipótese de que doses não letais de MFA, em sua forma pura, seriam capazes de induzir a resistência (Oliveira et al. 2013), porém alguns aspectos da intoxicação permanecem obscuros. Dentre estes, podemos citar a grande variação na sensibilidade à intoxicação mesmo entre indivíduos da mesma espécie e também a razão pela qual, alguns ovinos deste estudo desenvolveram intoxicação grave após receberem uma determinada dose do MFA e não se intoxicaram quando receberam a mesma dose dez dias após.

Conforme demonstrado no Quadro 2, as doses tóxicas de MFA administradas no presente estudo são inferiores à quantidade mínima de folhas necessária para causar intoxicação, considerando-se a quantidade deste princípio presente em cada espécie de planta. Portanto, o princípio quando administrado em sua forma pura, é mais tóxico do que quando ingerido através do consumo de plantas dos gêneros *Amorimia* e *Palicourea*.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque S.S.C., Rocha B.P., Almeida V.M., Oliveira J.S., Riet-Correa F., Lee S.T., Evêncio Neto J. & Mendonça F.S. 2014. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(5):433-437.
- Bandinelli M.B., Bassuino D.M., Fredo G., Mari C., Driemeier D., Sonne L. & Pavarini S.P. 2014. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. *Pesq. Vet. Bras.* 34(9):837-844.
- Barbosa, R.R., Silva, I.P., Soto-Blanco, B. 2008. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.v.28 (12), p. 571-574.
- Barbosa, E.F.G., Cardoso, S.P., Cabral Filho, S.L.S., Borges, J.R.J., Lima, E.M.M., Riet-Correa, F., Castro, M.B. 2015. Sinais clínicos e patologia da intoxicação crônica experimental de caprinos por *Palicourea marcgravii*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(3):209-215.
- Bosakowski T. & Levin A.A. 1986. Serum citrate as a peripheral indicator of fluoroacetate and fluorocitrate toxicity in rats and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85:428-436.
- Becker, M., Caldeira, F.H.B., Carneiro, F.M., Oliveira, L.P., Tokarnia, C.H., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Colodel, E.M. 2013. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.33 (9), p. 1049-1056.
- Borboleta, L.R., Labarrère, C.R., Ribeiro, A.F.C., Paes-Leme, F.O., Paes, P.R.O., Ocarino, N.M., Melo, M.M. 2011. Perfil bioquímico sanguíneo na intoxicação experimental com extrato de *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) em coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.5, p.1113-1123
- Collicchio-Zuanaze, R.C. Perfil hematológico, bioquímico, histopatológico e toxicológico de gatos induzidos experimentalmente com monofluoroacetato de sódio. Botucatu, 2006, 168p. Defesa de Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2006. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Diniz, P.P.V.P., Schwartz, D.S., Collicchio-Zuanaze, R.C. 2007. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dog: two case reports. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 59 (1),p. 85-89.
- Duarte A.L.L., Medeiros R.M.T., Carvalho F.K.L., Lee S.T., Cook D., Pfister J.A., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2013. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (*Mascagnia*) *septentrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* v. 34(2):220-223.
- Fredericks, S.; Merton, G. K.; Lerena, M. J.; Heining, P.; Carter, N. D.; Holt, D. W. 2001. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clinical Chimica Acta*, v. 304, p. 65-74.
- Giannitti, F., Anderson, M., Caspe, S.G., Mete, A., East, N.E., Mostrom, M., Poppenga, R. 2013. Na outbreak of sodium fluoracetate (1080) intoxication in selenium and copper-deficient sheep in California. *Veterinary Pathology*. V. 50(6), p. 1022-1027.
- Humphreys D.J. 1988. *Veterinary Toxicology*. 3rd ed. Bailliere Tindall, London. 356p.
- Krebs H.C., Kemmerling W. & Habermehl G. 1994. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. *Toxicon* 32:909-913.
- Kimball B.A., Provenza F.D. & Burritt E.A. 2002. Importance of alternative foods on the persistence of flavor aversions: implications for applied flavor avoidance learning. *Applied Animal Behaviour Science*. v. 76, p.249-258.
- Lee S.T., Cook D., Riet-Correa F., Pfister J.A., Anderson W.R., Lima F.G. & Gardner D. 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon* 60:791-796.
- Lee, S. T., Cook, D., Pfister, J. A., Allen, J. G., Colegate, S. M., Riet-Correa, F. & Taylor, C. M. 2014. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 62, p. 7345-7354.
- Lopes D.I.S., Sousa, M.G., Ramos, A.T., Maruo, V.M. 2016. Cardiotoxicity of *Senna occidentalis* in sheep (*Ovis aries*). *Open Veterinary Journal*. v.6 (1), p. 30-35.
- Melo, M.M., Verçosa Júnior, D., Pinto, M.C.L., Silveira, J.B., Ferraz, V., Ecco, R., Paes, P.R.O. 2008. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arq. Bras. Vet. Zootec.* v.60 (3), p. 631-640.
- Morris, C.A., Towers, N.R., Tempero, H.J. 1991. Breeding for resistance to facial eczema in dairy cattle. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. v. 53, p. 221-224.
- Nogueira V.A., França T.N., Peixoto T.C., Caldas S.A., Armien A.G. & Peixoto P.V. 2010. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(7):533-540.

- Oliveira M.D., Riet-Correa F., Carvalho F.K.L., Silva G.B., Pereira W.S. & Medeiros R. M.T. 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):731-734.
- Oliveira, M.D., Riet-Correa, F., Silva, G.B., Pereira, W.S., Freire, L.F.S., Medeiros, R.M.T. 2014. Aversão alimentar condicionada para o controle da intoxicação por *Palicourea aeneofusca*. *Ciência Rural*, v. 44 (7), p. 1246-1248.
- Peixoto T.C., Nogueira V.A., Coelho C.D., Veiga C.C.P., Peixoto P.V. & Brito M.F. 2010. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12):1021-1030.
- Peixoto, T.C., Oliveira, L.I., Caldas, S.A., Catunda Junior, F.E.A., Carvalho, M.G., França, T.N. 2012. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. *Pesq. Vet. Bras.* v.31(11):938-52.
- Peixoto, T.C., Nogueira, V.A., Caldas, S.A., França, T.N., Anjos, B.L., Aragão, A.P. & Peixoto, P.V. 2012. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq. Vet. Bras.* v.32 (4):219-328.
- Pessoa, D.A.N., Silva, L.C.A., Lopes, J.R.G., Macêdo, M.M.S., Garino Junior, F., Azevedo, S.S. & Riet-Correa, F. 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 35, n. 2, p.115-128.
- Ralphs M.H. 1997. Long term retention of aversions to tall larkspur in naive and native cattle. *Journal of Range Management*. v. 50, p. 367-370.
- Ralphs M.H. 2001. Plant toxicants and livestock: prevention and management, p.441-470. In: Hui Y.H., Smith R.A. & Spoerke Jr D.G. (Ed.), *Foodborne Disease Handbook*. 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Santos A.C., Riet-Correa F., Heckler R.F., Lima S.C., Silva M.L., Rezende R., Carvalho N.M. & Lemos R.A.A. 2014. Administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos, *Pesq. Vet. Bras.* v. 34(7):649-654.
- Schons S.V., Mello T.L., Riet-Correa F. & Schild A.L. 2011. Poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septium* in sheep in northern Brazil. *Toxicon* 57:781-786.
- Silva, L.C.A., Pessoa, D.A.N., Lopes, J.R.G., Albuquerque, L.G., Silva, L.S.A., Garino Júnior, F., Riet-Correa, F. 2016. Protection against, *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bactéria. *Toxicon*. 111: 65-68.
- Soares M.P., Pavarini S.P., Adrien M.L., Quevedo P.S., Schild A.L., Peixoto P.V., Farias da Cruz C.S. & Driemeier D. 2011. *Amorimia exotropa* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 23(6):1223-1229.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. *Plantas tóxicas do Brasil*. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p.

Legendas das figuras

Fig.1. Valores médios de aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase fração MB (CKMB), glicose e cálcio ionizado dos ovinos dos Grupos 1 e 2.

Quadro 1. Principais dados sobre o período experimental, dose recebida, sinais clínicos, frequência cardíaca inicial e final de cada período e desfecho da indução de resistência à administração de monofluoroacetato (MFA) em ovinos.

	Dose recebida	Frequência cardíaca inicial	Frequência cardíaca final	Sinais clínicos	Desfecho
Período 2					
Ovino 1	4 doses de 0,08 mg/kg	60 bpm*	NA**	Anorexia, apatia, relutância em movimentar-se, afastamento dos membros pélvicos, incoordenação, tremores musculares	Recuperação
Ovino 2	4 doses de 0,08 mg/kg	73 bpm	109 bpm	Anorexia, apatia, relutância em movimentar-se e afastamento dos membros pélvicos.	Recuperação
Período 3					
Ovino 1	4 doses de 0,08 mg/kg	62 bpm	77 bpm	Anorexia, incoordenação.	Recuperação
Ovino 3	4 doses de 0,08 mg/kg	55 bpm	163 bpm	Anorexia, apatia, incoordenação, membros pélvicos afastados e decúbito esternal.	Recuperação
Período 4					
Ovino 1	2 doses de 0,1 mg/kg	57 bpm	NA	Ausência de sinais clínicos.	Morte
Ovino 3	3 doses de 0,1 mg/kg	55 bpm	77 bpm	Anorexia, apatia, incoordenação, membros pélvicos afastados, tremores musculares, quedas frequentes.	Recuperação (tratamento com acetamida)
Período 6					
Ovino 2	2 doses de 0,25 mg/kg	69 bpm	101 bpm	Incoordenação e tremores musculares.	Recuperação (tratamento com acetamida)
Ovino 3	2 doses de 0,25 mg/kg	63 bpm	81 bpm	Incoordenação e tremores musculares.	Recuperação (tratamento com acetamida)
Ovino 4	1 dose de 0,25 mg/kg	62 bpm	NA	Ausência de sinais clínicos.	Morte
Ovino 5	1 dose de 0,25 mg/kg	52 bpm	NA	Ausência de sinais clínicos.	Morte

*bpm – batimentos por minuto.

**NA – não avaliado.

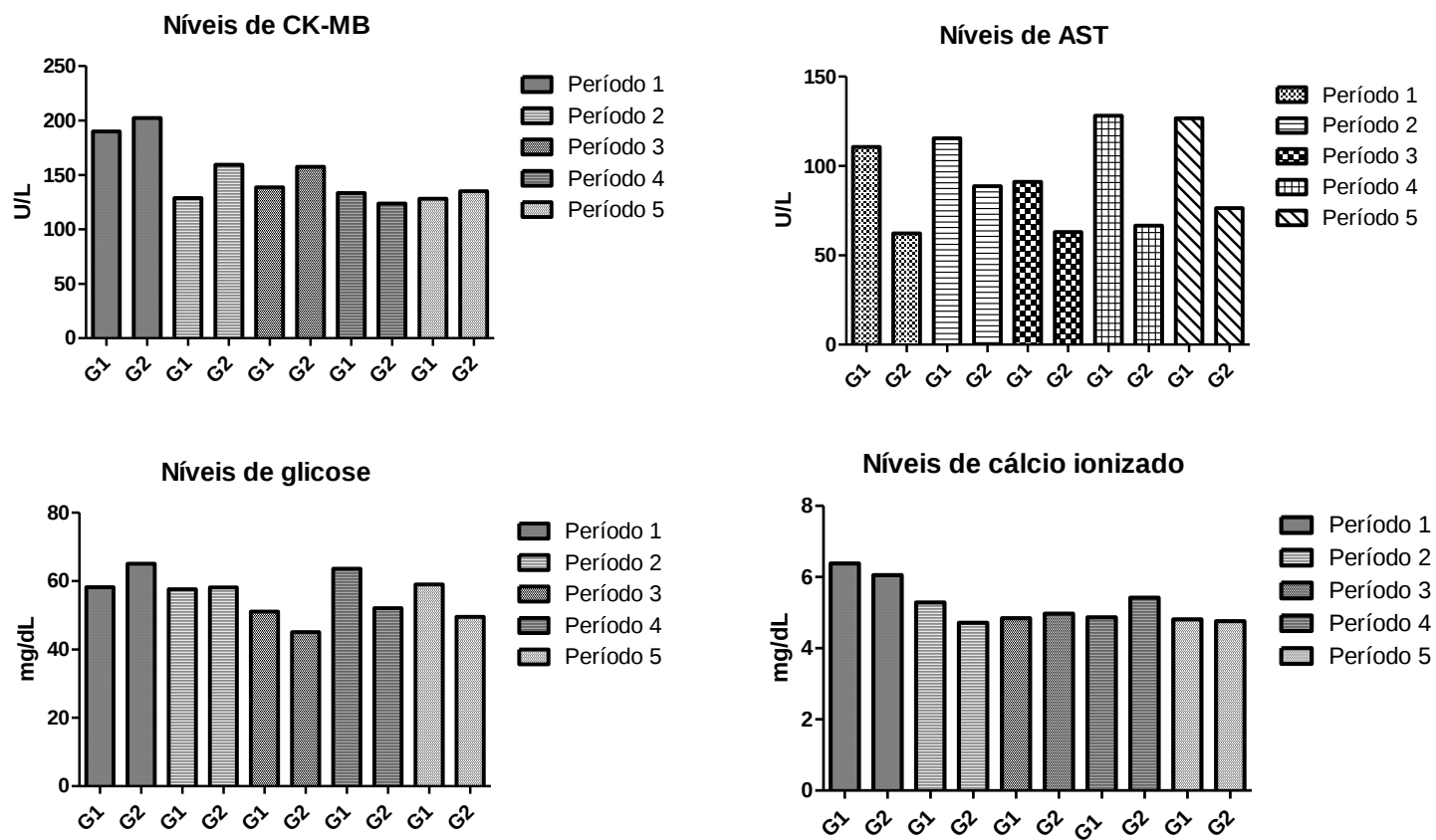
Quadro 2 - Comparação entre as doses de MFA recebidas pelos animais do presente estudo e a quantidade desta substância presente em espécies de *Amorimia* e *Palicourea*

Plantas	Teores de MFA* (µg/mg)	Doses mínimas tóxicas** (g/kg)	Quantidade equivalente de planta necessária para atingir as doses utilizadas no experimento	
			(g/kg)	
			0,25 (mg/kg)	0,5 (mg/kg)
<i>A. pubiflora</i>	0,15	5	1,66	3,33
<i>A. exotropica</i>	0,2	5	1,25	2,5
<i>A. rigida</i>	0,02	5	12,5	25
<i>A. septentrionalis</i>	0,029	5	8,62	17,24
<i>P. marcgravii</i> (folhas jovens)	9,6	0,5	0,026	0,05
<i>P. marcgravii</i> (folhas maduras)	3,8	0,5	0,065	0,31
<i>P. aneofusca</i>	1,4	0,6	0,178	0,223

* Lee et al. 2012 e Becker et al. 2013.

**Tokarnia et al. 2012.

Figura 1.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

- c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores.** Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;
- d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;
- e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);
- f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.
3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).
4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).
5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas.** Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.