

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EVIDÊNCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE OVINOS  
INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM SEMENTES  
DE *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoidea)**

**Diana Consuelo Cifuentes Sánchez**

Médica Veterinária Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EVIDÊNCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE OVINOS  
INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM SEMENTES  
DE *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoidea)**

**Diana Consuelo Cifuentes Sánchez**

**Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2011

Cifuentes Sánchez, Diana Consuelo  
C569e Evidências clínico-patológicas de ovinos intoxicados  
experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis*  
(leg.papilionoidea)/ Diana Consuelo Cifuentes Sánchez. --  
Jaboticabal, 2010  
xiii, 50 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual  
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
2010

Orientador: Mario Roberto Hatayde  
Banca examinadora: Julio Carlos Canola, Adriana  
Coelho de Souza.

Bibliografia

1. Plantas hepatotóxicas. 2. Intoxicação experimental.  
3. Monocrotalina. 4. Ovinos. I. Título. II. Jaboticabal -  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-099:636.3

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**DIANA CONSUELO CIFUENTES SÁNCHEZ** – nascida em 10 de novembro de 1982 na cidade de Bogotá - Colômbia, filha de Isaias Cifuentes Vásquez e Efigenia Sánchez Mancera. Ingressou em agosto de 2003 no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidad de los Llanos – UNILLANOS – Villavicencio, concluindo-o em dezembro de 2008. Realizou estágio junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel na área de Clínica Médica de Grandes Animais no ano de 2008. Em março de 2009 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na FCAV-UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

**O SENHOR** é o meu pastor, nada me falta, Ele me faz descansar em verdes prados, a águas tranquilas me conduz. Restaura minhas forças, guia-me pelo caminho certo, por amor do seu nome. Se eu tiver de andar por vale escuro, não temerei mal nenhum, pois comigo estás. O teu bastão e teu cajado me dão segurança. Diante de mim preparas uma mesa aos olhos de meus inimigos; unges com óleo minha cabeça, meu cálice transborda. Felicidade e graça vão me acompanhar todos os dias da minha vida e vou morar na casa do Senhor por muitíssimos anos.

**SALMO 23**

### DEDICO...

A ti meu amado **Deus** porque tudo o que sou e o que tenho é dádiva do teu infinito amor.

Aos meus amados pais, **Isaias Cifuentes** e **Efigenia Sánchez**, e aos meus irmãos, **Paola Cifuentes**, **Andrea Cifuentes**, **Isaias Cifuentes** e **Jorge Luis Cifuentes**, por acreditarem em mim e sempre me lembrarem que tenho uma família que me ama e espera sempre por mim.

A minha querida velinha **Ligia Melo** por seu amor e suas orações.

A **Daniel Rodriguez**, pelo apoio e amor incondicional.

A toda a comunidade da Paróquia de Santa Teresa por me acolher com tanto carinho e me permitir fazer parte de suas vidas, tornando assim mais fácil este tempo longe dos meus. Muito Obrigada !!

As minhas Amigas **Natalia Castillo**, **Adriane Molardi Bainy**, **Juliana Baldín**, **Verinha Mialick** e **Taisa Del Vechio**, pela amizade.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde**, por acreditar em mim e sempre me orientar de forma especial, ajudando no meu desenvolvimento pessoal e científico.

A minha querida amiga **Kalina Simplício**, por sua autêntica amizade e palavra certa em todo momento e pelo apoio incondicional na realização do experimento.

Ao **Prof. Dr. Julio Carlos Canola**, pela colaboração na realização das biópsias do experimento.

Ao **Prof. Dr. José Jurandir Fagliari**, por suas curtas, mas importantes orientações.

Ao **Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Médica Veterinária **Claudia Momo**, pelo auxílio na leitura das lâminas histológicas.

A Médica Veterinária **Lucimara Borges**, pela colaboração na realização do experimento.

Aos funcionários do Setor de Grandes Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pela ajuda quando necessária e pela amizade. Em especial a **Arildo Pereira dos Santos** por sua grande e incondicional colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, **Renata Lemos Nagib Jorge**, **Cláudia Aparecida da Silva**

**Nogueira e Paulo César da Silva**, pelo auxílio no processamento das amostras e análises laboratoriais e por tantos momentos vividos.

A **Francisca de Assis Ardisson**, pela elaboração das lâminas histológicas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização e conclusão deste estudo.

A **FCAV – UNESP** – Câmpus de Jaboticabal, em particular ao curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, por ter me acolhido e proporcionado a possibilidade de realizar este trabalho.

Ao **CNPq**, pela bolsa de estudos concedida.

A **FAPESP** pelo auxílio financeiro neste projeto.



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS.. .....	x
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	Xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
3.1 Objetivo geral .....	11
3.2 Objetivos específicos .....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
4.1 Animais e instalações .....	12
4.2 Delineamento experimental .....	12
4.2.1 Modelo de indução da intoxicação experimental .....	12
4.3 Procedimentos .....	13
4.3.1 Exame físico .....	13
4.3.2 Colheita de amostras de sangue .....	14
4.3.3 Hemograma .....	14
4.3.4 Bioquímica sérica .....	14
4.3.5 Avaliação ultrassonográfica e biópsia hepática .....	15
4.3.6 Exame histológico.....	16
4.4 Análise estatística .....	17
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
5.1 Exame físico .....	19
5.2 Hematologia .....	20
5.2.1 Leucograma .....	20
5.2.2 Eritrograma .....	21

5.3 Perfil Bioquímico .....	24
5.3.1 Enzimas .....	24
5.4 Proteinograma sérico .....	27
5.5 Exame ultrassonográfico .....	28
5.6 Exame Histológico .....	33
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
APÊNDICE .....	48

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APs</b>	Alcalóides pirrolizidínicos
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>Cebea</b>	Comissão de ética e bem – estar animal
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular médio
<b>CIDASC</b>	Companhia integrada de desenvolvimento agrícola de Santa Catarina
<b>CK</b>	Creatina fosfoquinase
<b>EDTA</b>	Ácido dietilenodiamino teracético
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>fL</b>	Fentolitro
<b>g/dL</b>	Gramas por decilitro
<b>GGT</b>	Gamaglutamiltransferase
<b>HE</b>	Hematoxilina- eosina
<b>MCT N-óxido</b>	Monocrotalina N-óxido
<b>MCT P</b>	Monocrotalina pirrol
<b>MCT</b>	Monocrotalina
<b>mg/dL</b>	Miligramas por decilitro
<b>NRC</b>	National Research Council
<b>PFA</b>	Proteínas de fase aguda
<b>S.A.S</b>	Statistical Analysis System
<b>SDS – PAGE</b>	Técnica de electroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
<b>U/L</b>	unidades internacionais por litro
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b>α – globulina</b>	Alfa – globulina
<b>β – globulina</b>	Beta – globulina
<b>γ – globulina</b>	Gama – globulina
<b>μL</b>	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Diferentes pontos de realização da biópsia hepática, em função do tempo de administração de sementes de <i>C. spectabilis</i> na ração.....	31
<b>Figura 2.</b> Ultrassonografia do parênquima hepático de ovino do G2 no tempo controle (T0), ilustrando a região de interesse (RI), onde é verificado o grau de congestão hepática através da quantificação do número de pixels. Regiões dorsal (D) e ventral (V) do animal, região de pele e tecido subcutâneo (P/S), região diafragmática (DF).....	31
<b>Figura 3.</b> Ultrassonografia em plano transversal do parênquima hepático de ovino do grupo G3 no 14º dia após inclusão das sementes (T2), mostrando a dilatação da veia porta (VP), congestão hepática (C), hiperecogenicidade decorrente do efeito de reverberação do eco no momento do disparo.....	32
<b>Figura 4.</b> Representação gráfica do número de pixels de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração.....	33
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia do fígado de ovino do G2 no 7º dia de intoxicação (T1), ilustrando a presença de infiltrado polimorfonuclear periportal acentuado (cabeça da seta negra), proliferação dos ductos biliares com fibrose (seta negra). Coloração HE aumento de 400X.....	35
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografia de ovino G2 no 14º dia de intoxicação (T2), ilustrando a presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (cabeça da seta negra), degeneração gordurosa difusa discreta (cabeça da seta branca), uma grande área de necrose multifocal moderada (seta branca). Coloração HE, aumento de 400X.....	35
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia de ovino do G3 no 14º dia de intoxicação (T2), ilustrando a presença de infiltrado inflamatório mononuclear acentuado (cabeça da seta), e polimorfonuclear multifocal discreto (seta negra), área de necrose (seta branca). Coloração HE, aumento de 400X.....	36
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de ovino do G3 no 14º dia de intoxicação (T2), ilustrando a presença de infiltrado inflamatório mononuclear periportal acentuado (cabeça da seta), degeneração hidrópica (seta negra). Coloração HE, aumento de 400X.....	36

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Médias e desvios - padrão dos parâmetros da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e da temperatura corpórea (Temp.), de ovinos alimentados com diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	19
<b>Tabela 2.</b> Médias e desvios-padrão do peso corporal (kg) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	20
<b>Tabela 3.</b> Médias e desvios-padrão da contagem total de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010....	20
<b>Tabela 4.</b> Médias e desvios - padrão da contagem total de linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	21
<b>Tabela 5.</b> Médias e desvios - padrão da contagem total de neutrófilos segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	21
<b>Tabela 6.</b> Médias e desvios - padrão do número de eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) no sangue de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	22
<b>Tabela 7.</b> Médias e desvios - padrão do volume globular (%) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	23
<b>Tabela 8.</b> Médias e desvios - padrão do teor de hemoglobina (g/dL) no sangue de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	23
<b>Tabela 9.</b> Médias e desvios - padrão da atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase (U/L) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	24

<b>Tabela 10.</b> Médias e desvios - padrão da atividade sérica da enzima aspartato aminotransferase (U/L) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	25
<b>Tabela 11.</b> Médias e desvios - padrão da atividade sérica da enzima creatina fosfoquinase (U/L) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	26
<b>Tabela 12.</b> Médias e desvios - padrão da concentração sérica de proteína total (g/dL) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	26
<b>Tabela 13.</b> Médias e desvios - padrão da concentração sérica de albumina (g/dL) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	27
<b>Tabela 14.</b> Concentrações séricas de proteínas (médias $\pm$ desvios-padrão (mg/dL) obtidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	29
<b>Tabela 15.</b> Médias e desvios-padrões do grau de número de pixels de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.....	33

**EVIDÊNCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE OVINOS INTOXICADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM SEMENTES DE *Crotalaria spectabilis*  
(Leg.Papilionoidea)**

**RESUMO** - Foram utilizadas 15 fêmeas ovinas, sem raça definida, alocadas em três grupos de cinco animais cada, com porcentagens de inclusão de 0,4% (G1), 0,6% (G2) e 1% (G3), de sementes de *C. spectabilis* trituradas e misturadas na ração, num período experimental de 28 dias. As colheitas de amostras sanguíneas e biópsias hepáticas para exame histológico seguiram o esquema: T0 (dia anterior à inclusão de sementes), T1 (7 dias após inclusão das sementes), T2 (14 dias após inclusão das sementes), T3 (21 dias após inclusão das sementes) e T4 (28 dias após inclusão das sementes). As amostras de tecido hepático foram obtidas através da técnica de biópsia percutânea com agulha de tipo tru-cut guiada por ultrassom. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com auxílio do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS-Versão 9.1). Os contrastes de média pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $p < 0,05$ ). Clinicamente apenas um animal do G3 no 21º dia após a inclusão de sementes (T3) apresentou sinais clínicos de intoxicação por *C. spectabilis*. Os resultados dos parâmetros hematológicos mantiveram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie. As atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e creatina fosfoquinase (CK) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, enquanto gamaglutamiltransferase (GGT) apresentou diferença significativa entre o G1 ( $33,66 \pm 25,8$  U/L) e o G2 ( $67,3 \pm 14,8$  U/L) ambos no momento controle (T0). À avaliação ultrassonográfica evidenciou-se alterações hepáticas ao longo de todo o período experimental sendo confirmadas pelos achados histológicos. Concluiu-se que a análise do hemograma e das provas de função hepática isoladamente não têm valor diagnóstico para a intoxicação por *C. spectabilis* em ovinos, fazendo-se necessário a realização de exames complementares, como a ultrassonografia e a biópsia hepática percutânea.

**Palavras-Chave:** Plantas hepatotóxicas, intoxicação experimental, monocrotalina, ovinos.

## CLINICAL AND LABORATORIAL EVALUATION OF SHEEP EXPERIMENTALLY INTOXICATED WITH *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoidea) SEEDS

**SUMMARY** - Fifteen (15) ovine females, with no defined breed were allotted in three groups. Each group had five animals and different inclusion percentage of the *Crotalaria spectabilis* seeds, 0,4% (G1), 0,6% (G2) e 1% (G3). The seeds were grinded, mixed in the ration and supplied once/day to the animals through 28 days. Blood sampling and hepatic biopsies were accomplished as follows: T0 (day prior to intoxication), T1 (7 days after seed inclusion), T2 (14 days after inclusion), T3 (21 days after inclusion) and T4 (28 days after inclusion). Hepatic tissue samples were obtained by the percutain biopse technique with tru-cut needles guided by ultrasound. Results were submitted to variance analysis (ANOVA) aided by the Statistical Analysis System (SAS-Versão 9.1). The means contrasts were accomplished by Tukey test, with 95% of reliability ( $p < 0,05$ ). Only one (1) animal from G3 on the 21<sup>st</sup> day after seed inclusion (T3) showed clinical signs of intoxication. Hematological parameters stayed within normality range for ovine species. Serum activity of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) did not show significant difference between groups, while gama-glutamyl tranferase (GGT) showed difference between G1 ( $33,66 \pm 25,8$  U/L) and G2 ( $67,3 \pm 14,8$  U/L), both in the control moment (T0). Ultrasound examination evidenced hepatic alterations during the whole experimental period which was confirmed by histological findings. It was concluded that both hemogram and hepatic function analysis isolated has no diagnostic value in *C.spectabillis* intoxication in sheep being necessary to perform some complementary exams, like ultrasound examination and percutain hepatic biopse.

**Key words:** Hepatotoxic plants, experimental intoxication, monocrotaline, sheep.



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil há, pelo menos, 35 espécies de plantas hepatotóxicas distribuídas em 16 gêneros e que podem ser divididas em três grupos: plantas que causam necrose hepática aguda, plantas que causam fibrose hepática e plantas que causam fotossensibilização (SANTOS et al. 2008).

As perdas econômicas ocasionadas pelas intoxicações por plantas podem ser definidas como diretas ou indiretas. As perdas diretas são causadas pela morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos, redução da produtividade nos animais sobreviventes, alterações decorrentes de doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção, e aumento da susceptibilidade à outras doenças decorrente da depressão imunológica. As perdas indiretas incluem custos com o controle das plantas tóxicas nas pastagens, medidas de manejo para evitar intoxicações, como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem em razão ao atraso na sua utilização e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e tratamento dos animais afetados. As perdas econômicas causadas pelas intoxicações por plantas são difíceis de estimar por não existirem dados confiáveis sobre todos os componentes envolvidos. No entanto, as perdas causadas por mortes são fáceis de determinar quando se dispõe de dados elaborados por laboratórios de diagnóstico, sobre a frequência das causas de mortes numa determinada região (RIET-CORREA et al. 1993).

Apesar de amplamente utilizadas como adubação verde as plantas do gênero *Crotalaria* contêm alcalóides pirrolizidínicos (APs) que são tóxicos aos animais e ao homem (KAY & HEATH, 1969; YAN et al. 1995; COPPLE et al. 2004; WANG et al. 2005). O quadro clínico-patológico apresentado pela maioria dos animais intoxicados naturalmente e experimentalmente é consistente com o de insuficiência hepática (NOBRE et al. 2005). Considerando-se a falta de estudos experimentais que demonstrem as alterações clínico-patológicas e bioquímicas em ovinos intoxicados experimentalmente com sementes de *C. spectabilis* elaborou-se este estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Crotalaria* pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, que compreende cerca de 600 espécies, distribuídas especialmente em áreas tropicais e subtropicais do planeta (WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987). As plantas do gênero *Crotalaria* são amplamente utilizadas como adubação verde, destinadas à recuperação de solos empobrecidos, em consórcio com culturas como o milho. Para tal finalidade, a crotalária é plantada e posteriormente incorporada ao solo, melhorando o conteúdo de compostos nitrogenados essenciais para outras culturas, além de evitar a erosão (JOLY, 1977; LORENZI, 1991).

Plantas do gênero *Crotalaria* são vulgarmente conhecidas por "xique-xique", "guizo-de-cascavel" ou "chocalho-de-cascavel", pois os frutos, quando secos, produzem som semelhante ao de chocalho ao serem tocados. Também em função disso é que a planta recebeu o nome científico de *Crotalaria*, termo que, em latim, significa chocalho (TOKARNIA et al. 2000).

Atualmente algumas espécies de crotalaria são consideradas invasoras devido à sua vasta disseminação (LEITÃO FILHO et al. 1975). Segundo LORENZI (1991), a *C. spectabilis* é uma planta anual, subarborescente, ereta, ramificada, glabra, medindo entre 70 e 100 cm, com reprodução por sementes. Suas folhas são simples, mucronadas no ápice, glabras na face superior e pubescentes na inferior, apresentando de 6 a 12 cm de comprimento e de 2 a 4 cm de largura, com estípulas de 5 a 7 cm de comprimento. Apresenta flores amarelas que crescem em racemos terminais e auxiliares de até 30 cm de comprimento, com 20 a 40 flores. As vagens com sementes imaturas são verdes e escurecem gradualmente, até tornarem-se pretas quando maduras. As sementes são firmes, pretas e lustrosas, medem 4 x 3 x 2mm e pesam 13,8 mg, em média.

Segundo a Portaria n°. 845 de 08 de novembro de 1976, disponível na página digital da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), impurezas são consideradas as do próprio produto bem como os grãos ou fragmentos de grãos que vazarem numa peneira de crivos circulares de 5 mm (cinco

milímetros) de diâmetro. Portanto, as sementes de *crotalaria* são consideradas impurezas se presentes em ração animal por atravessarem a peneira.

Nos Estados Unidos da América, a *C. spectabilis* tem sido extensivamente usada como adubação verde em solos leves, disseminando e tornando-se silvestre. Neste País, onde a espécie é considerada a mais tóxica do gênero, espaços naturais de intoxicação têm sido descritos em equinos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves (CLARKE & CLARKE, 1967).

Plantas do gênero *Crotalaria* contêm alcalóides pirrolizidínicos (APs) constituintes comuns de uma centena de espécies de plantas. Os APs são encontrados em mais de 20 grandes famílias de plantas, entretanto, apenas três famílias - Boraginaceae, Compositae (Asteraceae), e Leguminosae (Fabaceae) contêm os alcalóides considerados mais tóxicos. WILLIAMS & MOLYNEUX (1987), estudando a concentração de APs em sementes de 41 espécies de *crotalaria*, provenientes do Brasil, verificaram que nas amostras de *C. spectabilis* havia maior quantidade de APs quando comparadas às outras.

O principal alcalóide pirrolizidínico contido na *C. spectabilis* é a monocrotalina (MCT), a qual foi isolada por NEAL et al. (1935), podendo ser encontrada em todas as partes da planta (PIERCY & RUSOFF, 1946). No entanto nas sementes foi constatada uma quantidade de até 3,98% do peso seco (JOHNSON et al. 1985; WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987). A espectabilina, outro alcalóide pirrolizidínico, também pode ser encontrada em pequenas quantidades (BULL et al. 1968).

A MCT é um alcalóide tipo retronecina, formado por uma base de necina (retronecina) com dupla ligação entre os carbonos 1 e 2, associada a um ácido necínico (ácido monocrotálico), que além de efeito tóxico apresenta também atividade neoplásica. Os ácidos necínicos contêm de quatro a seis átomos de carbono podendo ser ácidos mono ou dicarboxílicos, sendo encontrados principalmente nos alcalóides pirrolizidínicos que exibem efeitos tóxicos e são derivados de ésteres de álcoois básicos (TAYLOR et al. 1997; FU et al. 2002; COPPLE et al. 2003; WANG et al. 2005).

Quanto ao metabolismo da MCT, TAYLOR et al. (1997), mostraram que a mesma pode sofrer diferentes processos metabólicos no interior dos hepatócitos. FU et al. (2002) e WANG et al. (2005) consideraram que o metabolismo da MCT está diretamente relacionado a três processos principais:

1. Hidrólise do grupo funcional éster, para formação da base retronecina e ácido monocrotálico;
2. Processo de N-oxidação da base retronecina, promovendo a formação de monocrotalina N - óxido (MCT N – óxido);
3. Formação de derivados dehidrocrotalina ou monocrotalina pirrol (MCTP) através da hidroxilação das posições C-3 ou C-8 da base retronecina.

Esses compostos altamente reativos ligam-se de forma covalente ao DNA ou às enzimas hepáticas (MATTOCKS, 1968) causando danos hepáticos que vão desde edema e necrose centrolobular, megalocitose, cariomegalia, fibrose, proliferação de ductos biliares, veno-oclusão até perda total da função hepática (CHEEKE & SHULL, 1985; SCHULTZE et al. 1996; HANUMEGOWDA et al. 2003; WANG et al. 2005). Segundo COPPLE et al. (2002), a MCTP, também denominada dehidromonocrotalina, é o metabólito responsável pela toxicidade da MCT “in vivo” induzindo efeitos tóxicos sobre o fígado e o pulmão, desencadeando neste último a denominada hipertensão pulmonar.

A exposição por um longo período a essas substâncias causa megalocitose de hepatócitos, veno-oclusão no fígado e nos pulmões, degeneração gordurosa, aumento do tamanho dos núcleos com adensamento da cromatina nuclear, perda da função metabólica, inibição de mitoses, proliferação do epitélio do trato biliar, cirrose hepática, hiperplasia nodular e adenomas ou adenocarcinomas (COPPLE et al. 2002; FU et al. 2002; COPPLE et al. 2003; WANG et al. 2005). Segundo FU et al. (2002), o envenenamento agudo causa hepatotoxicidade massiva com quadros de necrose hemorrágica, enquanto o envenenamento crônico causa lesões em vários órgãos, como fígado, pulmões, vasos sanguíneos, rins, pâncreas, trato gastrintestinal, medula óssea e

cérebro. A insuficiência hepática ocorre quando 70% ou mais da capacidade funcional do fígado é perdida (TENNANT, 1997), o que acontece quando há perda de 80% a 90% do parênquima hepático, podendo ser visto, tanto em hepatopatias tóxicas agudas quanto crônicas (KELLY, 1993).

Neste contexto, a avaliação da função hepática torna-se importante. A patogenia de doenças hepáticas em animais domésticos é muito complexa, por tanto, o diagnóstico dessas enfermidades também envolve a dosagem de parâmetros bioquímicos séricos entre os quais estão as dosagens das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT), que revelam e confirmam a presença de lesão hepática aguda ou crônica. Entretanto, é válido ressaltar que aumento nos níveis de GGT indica a presença de lesões crônicas nos ductos biliares, servindo como marcador sérico primário para doenças do sistema hepatobiliar associadas à colestase. Já a AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial, presente em vários tecidos como fígado, músculos esquelético e cardíaco e em todas as espécies domésticas sua atividade hepática é alta, portanto, marcadamente elevada na lesão hepática aguda ou crônica (TENNANT, 1997).

Creatina fosfoquinase (CK) é uma enzima amplamente utilizada para determinar alterações musculares em animais domésticos, por ser considerada um indicador altamente sensível e específico de lesão muscular, já que a principal fonte dessa enzima são fibras musculares (CARDINET, 1997).

Ao analisar enzimas musculares e hepatobiliares, STOCKHAM (1995) cita que o aumento nos valores séricos de AST, com atividade normal de CK, ocorre em razão de doença hepatobiliar e não de dano muscular, entretanto, deve-se ter cautela nessa conclusão já que a meia-vida da CK circulante é menor que a da AST.

A GGT é uma enzima de membrana associada a numerosos tecidos como fígado, rins, pâncreas e intestino (MEYER et al. 1995; TENNANT, 1997). A maior quantidade de GGT celular está nas células tubulares renais e no epitélio dos ductos biliares (KRAMER & HOFFMANN, 1997). Sua atividade é relativamente alta no fígado de bovinos, equinos, ovinos e caprinos, com menor atividade em caninos e felinos.

Mesmo que a GGT esteja presente em vários tecidos, elevações na sua atividade sérica são observadas primariamente em desordens hepáticas (TENNANT, 1997). Entretanto, a colestase provoca aumento na atividade sérica dessa enzima em todas as espécies (MEYER et al. 1995; KRAMER & HOFFMANN, 1997), com melhor utilidade diagnóstica que a fosfatase alcalina (FA), em equinos e ruminantes (MEYER et al. 1995), em razão do amplo intervalo de referência da FA nestas espécies (DUNCAN et al. 1994).

A resposta sistêmica a algumas enfermidades é acompanhada por aumento nos níveis de um grande número de proteínas séricas, dentre as quais as proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2000). A concentração circulante dessas proteínas está relacionada à severidade da condição orgânica e, portanto, sua quantificação fornece, prontamente, um meio de avaliar a presença e a extensão do processo inflamatório (ECKERSALL, 2000; O'MAHONY et al. 2006).

Segundo KANEKO et al. (1997), o fracionamento eletroforético representa uma das mais confiáveis técnicas de identificação de proteínas sanguíneas, que podem ser classificadas em albumina, alfa-globulina ( $\alpha$ -globulina), beta-globulina ( $\beta$ -globulina) e gama-globulina ( $\gamma$ -globulina). O aumento das PFA também pode ser observado por meio de eletroforese das proteínas séricas e registro de elevação nas frações  $\alpha$  e/ou  $\beta$  (THOMAS, 2000). A albumina é a fração mais homogênea, solúvel, estável e é encontrada em maior quantidade no plasma. Possui a função de manter a pressão colóide osmótica plasmática, além de ser responsável pelo transporte de várias substâncias endógenas e exógenas. É sintetizada no fígado e constitui cerca de 35% a 40% do total de proteínas séricas (KANEKO et al. 1997).

A fração  $\alpha$ -globulina possui a função de carrear lipídeos, hormônios, vitaminas e minerais e nela estão contidas a antitripsina, transtiroxina, transcortina, protrombina, glicoproteína ácida, lipoproteína, trombina, haptoglobina, ceruloplasmina, macroglobina, HS-glicoproteína, várias enzimas e fatores de coagulação. A fração  $\beta$ -globulina tem grande importância no transporte do colesterol, estrógenos e progesterona. Nela estão contidas a transferrina, hemopexina, lipoproteínas, frações do complemento (C3, C4, e

C5), além de várias enzimas e fatores de coagulação. A fração  $\gamma$ -globulina é composta por substâncias imunologicamente ativas e a formação de anticorpos depende exclusivamente da porcentagem dessa fração protéica no soro. A fração  $\gamma$ -globulina é constituída por imunoglobulinas A, M, E, G e algumas enzimas. Em geral, a IgG representa 85% dessa fração, sendo responsável pelas modificações na curva de eletroforese (KANEKO et al. 1997).

As técnicas de eletroforese mais utilizadas em Medicina Veterinária têm como matrizes fitas de acetato de celulose ou filmes de agarose, as quais apresentam valor limitado porque permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas (FAGLIARI & SILVA, 2002). GORDON (1975) descreveu que a técnica de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, necessitando, apenas, micro-quantidade de amostra. O emprego da técnica SDS-PAGE pode ser útil na avaliação da cinética das proteínas de fase aguda da resposta inflamatória facilitando o estabelecimento do diagnóstico de doenças e do prognóstico de intercorrências no período pós-operatório (FAGLIARI & SILVA, 2002; FAGLIARI et al. 2006).

O diagnóstico de doença hepática envolve a combinação de anamnese, exame físico, exames laboratoriais complementares e eventualmente avaliação por recursos de imagem e histologia. Em determinadas condições, o perfil enzimático não atende às necessidades do clínico em responder a real natureza da hepatopatia. A biópsia hepática permite uma visão mais ampla da natureza da doença determinando o acesso à morfologia da lesão (TOSTES & BANDARRA, 2002). Nos últimos anos, a biópsia tem-se mostrado ferramenta importante na avaliação da função hepática em animais, e no diagnóstico e monitoramento das diversas lesões que acometem o fígado (MEDEIROS et al. 2002). Além disso, permite identificar o aparecimento das lesões antes que os sinais clínicos tornem-se aparentes, minimizando assim perdas econômicas mediante o controle de mortalidade dos animais afetados (DRIEMEIER, 1990).



Os benefícios da biópsia hepática são muitos. A facilidade de realização, assim como as poucas complicações envolvidas e a importância diagnóstica, tem incrementado seu uso. Apesar dos avanços nos métodos de investigação das doenças hepáticas, incluindo-se os de imagem e biologia molecular, o exame histológico do tecido hepático é essencial para o diagnóstico, especialmente nas hepatopatias crônicas (SHERLOCK et al. 1984). A biópsia hepática em ruminantes tem aplicação clínica, pois fornece aos profissionais informações sobre a estrutura morfológica do fígado (AMORIM et al. 2003), auxiliando no diagnóstico clínico de deficiências minerais, e na comprovação de determinadas intoxicações (ORTOLANI, 2008).

Das técnicas de biópsia hepática desenvolvidas para animais, a biópsia percutânea com agulhas tipo Tru-Cut prevalece como uma das mais utilizadas, tanto pela sua praticidade como pela possibilidade de oferecer menor risco ao paciente (TOSTES & BANDARRA, 2002).

AMORIM et al. (2003), estudando a técnica de biópsia hepática percutânea em bovinos, concluíram que a técnica é segura e eficaz por não provocar dano hepático extenso e por obter rapidamente fragmentos adequados para análise histológica. As pequenas lesões teciduais causadas por essa técnica não provocaram alterações significativas nas variáveis do hemograma, concentração plasmática de fibrinogênio e nas atividades séricas enzimáticas da fosfatasa alcalina ALP e GGT.

Outra ferramenta é a avaliação ultrassonográfica do parênquima hepático que segundo citado por BILLER et al. (1992), o padrão ultrassonográfico hepático normal consiste no fígado localizado no interior do gradil costal, com contornos lisos e margens de ângulos agudos, com ecotextura homogênea, levemente mais grosseira que o parênquima esplênico e com ecogenicidade igual ou discretamente maior que aquela do córtex renal e menor que a do baço e a do ligamento falciforme. O exame ultrassonográfico possui caráter subjetivo que podem gerar divergências para a interpretação de seus achados, no qual diferentes fatores podem influenciar no estabelecimento de um diagnóstico, tais como a experiência do avaliador, aparelho utilizado e regulagem de profundidade, ganho e contraste (ZWEIBEL, 1995; NYLAND et



al. 2004) Para tentar evitar possíveis erros de interpretação e minimizar a subjetividade do exame, podemos utilizar técnicas que quantificam a ecogenicidade e a ecotextura das regiões avaliadas. (LU et al. 1997; MAEDA et al. 1998). Uma destas técnicas é o método na escala de cinza que possibilita uma avaliação quantitativa da ecotextura e ecogenicidade de uma região previamente selecionada, demonstrando a distribuição de frequência na intensidade do eco na região de interesse e mensurando a quantidade de níveis de cinza. O aparelho de ultrassonografia gera uns valores que demonstra a variação dos espectros de cinza que compõem a imagem da área selecionada. A imagem ultrassonográfica é gerada em tons de cinza. Assim é formada pelo preto absoluto, com valor zero, passando por muitas tonalidades de cinza até o branco absoluto, valor 255. A dos níveis de cinza quantifica todas as tonalidades presentes na região de interesse selecionada. Esta forma de análise está disponível em muitos aparelhos ultra-sonográficos comerciais, entretanto sua aplicação tem sido restrita ao meio acadêmico, merecendo padronização de valores para maior uso na prática clínica e em protocolos experimentais na medicina humana e veterinária (MAEDA et al. 1998).

A ecogenicidade é representada por um valor (LMEAN), que indica a luminosidade média da região selecionada. Médias baixas do LMEAN indicam imagens mais escuras, e médias altas, corresponde a imagens mais claras.

Vários são os estudos que verificam a toxicidade das espécies de crotalárias em aves e animais domésticos (CLARKE & CLARKE, 1967; TOKARNIA & DOBEREINER, 1982; BURGUERA et al. 1983; ALFONSO et al. 1993; HATAYDE et al. 1997a; HATAYDE et al. 1997b; SOUZA et al. 1997; HATAYDE et al. 1998; SOUZA et al. 1998, NOBRE et al. 2005; MELO et al. 2010).

Bovinos e equinos são bastante susceptíveis à intoxicação por APs, sendo 30-40 vezes mais susceptíveis que ovinos e caprinos. Esta diferença parece estar relacionada à capacidade do ovino em detoxificar os APs no fígado, relacionada à dieta consumida antes da domesticação. Pequenos ruminantes são mais seletivos quanto à ingestão de alimentos, desenvolvendo, em virtude disso, resistência às toxinas (CKEEKE, 1994; RADOSTITS et al. 2002). A resistência dos ovinos é atribuída, também, a uma maior

quantidade de microorganismos no rúmen capazes de biotransformar esses alcalóides com maior eficiência que os bovinos (CRAIG et al. 1991). As diferentes respostas ou resistência individual dos animais aos APs podem ser reflexo da: 1) detoxificação bacteriana no trato gastrointestinal; 2) taxa de conversão, no fígado, dos APs a pirróis tóxicos e; 3) capacidade anti-oxidativa individual do animal. A quantidade de APs ingerida na alimentação também é importante (CRAIG et al. 1991).

Na intoxicação pelos APs em ovinos pode se observar três quadros clínicos: intoxicação crônica com fotossensibilização e/ou encefalopatia hepática, intoxicação crônica por cobre secundária, e intoxicação aguda. Na intoxicação crônica os animais apresentam sinais clínicos variáveis, que incluem emagrecimento progressivo, apatia, fraqueza, perturbações neurológicas como depressão, andar desequilibrado, pressão da cabeça contra objetos, icterícia e fotossensibilização. Histologicamente, observa-se fibrose periportal, proliferação de células epiteliais de ductos biliares, hepatomegalocitose e bilestase (ILHA et al. 2001, DANTAS et al. 2004). Achados ultra-estruturais no fígado incluem graus variáveis de degeneração hepatocelular caracterizada por acúmulo de numerosas gotas lipídicas no citoplasma de presença de lisossomos carregados de material eletrodense que, na maioria dos casos, correspondem à lipofuscina-ceróide. Adicionalmente, há discreta dilatação do retículo endoplasmático rugoso e moderada hiperplasia do retículo endoplasmático liso em algumas regiões do citoplasma dos hepatócitos (ILHA et al. 2001).

NOBRE et al. (2005) descreveram a intoxicação aguda pela ingestão de *C. retusa* em ovinos. Os sinais clínicos observados incluíram anorexia, depressão acentuada, icterícia moderada, incoordenação e decúbito. Os ovinos morreram cerca de 12 horas após os primeiros sinais clínicos. Na necropsia, o fígado apresentou aspecto de acentuação do padrão lobular com deposição de fibrina na superfície capsular. A vesícula biliar mostrou-se distendida e havia presença de hemorragias subepicárdicas e subendocárdicas, hidropericárdio, hidrotórax e ascite. Os autores relataram, ainda, que as sementes e vagens da planta podiam ser encontradas em grandes quantidades no rúmen dos ovinos que morreram da intoxicação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos tóxicos das sementes de *Crotalaria spectabilis* quando trituradas e adicionadas à ração de ovinos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar as alterações clínicas e laboratoriais de ovinos intoxicados experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis*;
- Identificar e descrever a lesão hepática induzida pela intoxicação experimental dos ovinos mediante biópsia hepática guiada por ultrassom.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias /UNESP/ Câmpus de Jaboticabal (protocolo nº012325-08).

### 4.1. Animais e instalações

Foram utilizadas 15 fêmeas ovinas, clinicamente sadias, sem raça definida, com aproximadamente três anos de idade e peso médio de 40 kg. Os animais foram alojados em gaiolas individuais equipadas com comedouros e bebedouros, situadas sob área coberta junto ao Setor de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia da FCAV-UNESP- Jaboticabal, SP e submetidas a sete dias de adaptação antes do início do experimento.

Durante o período experimental, foi fornecida dieta composta de feno de capim “coast cross”, água à vontade e ração farelada de milho e soja fornecida em duas refeições diárias segundo recomendações do NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC (2007). Uma vez observados sinais de intoxicação, confirmados pelos exames clínico e laboratorial, os animais receberam tratamento a base de protetores hepáticos<sup>1</sup> e soro glicofisiológico a 5%<sup>2</sup>, suspendendo-se a administração de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração durante o tratamento.

### 4.2. Delineamento experimental

#### 4.2.1 Modelo de indução da intoxicação experimental

Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos. Para cada grupo foi determinado um nível de inclusão de sementes de *C. spectabilis* trituradas e

---

<sup>1</sup> Mercepton injetável – Bravet Laboratórios

<sup>2</sup> Soro glicofisiológico a 5% - Glicolabor Indústria Farmacêutica LTDA.

previamente misturadas na ração, seguindo-se as proporções de 0,4%; 0,6% e 1,0%, como mostra o esquema abaixo.

G<sub>1</sub> (n=5) – Ração de manutenção + 0,4% de sementes.

G<sub>2</sub> (n=5) – Ração de manutenção + 0,6% de sementes.

G<sub>3</sub> (n=5) – Ração de manutenção+ 1,0% de sementes.

O período experimental totalizou 28 dias, sendo as amostras sanguíneas e biópsias hepáticas colhidas da seguinte forma:

T0 – dia anterior ao início da inclusão de sementes de *C. Spectabilllis* na ração (tempo controle).

T1 – sete dias após do início da inclusão de sementes de *C. Spectabilllis* na ração.

T2 – 14 dias após do início da inclusão de sementes de *C. Spectabilllis* na ração.

T3 – 21 dias após do início da inclusão de sementes de *C. Spectabilllis* na ração.

T4 – 28 dias após do início da inclusão de sementes de *C. Spectabilllis* na ração.

### **4.3. Procedimentos**

#### **4.3.1 Exame físico**

A partir do período de adaptação os ovinos foram diariamente submetidos ao exame físico, o qual foi realizado durante o período da manhã. Eram verificados comportamento, consumo de ração e feno, coloração das mucosas conjuntivais, frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal e contagem dos movimentos ruminais. Uma vez por semana os animais eram pesados.

### 4.3.2 Colheita de amostras de sangue

Semanalmente foram colhidas amostras de sangue, antes da realização da biópsia hepática, mediante venopunção jugular, em tubos esterilizados e siliconizados a vácuo<sup>3</sup> com e sem anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para obtenção de sangue total e soro, respectivamente.

As amostras sem anticoagulante foram mantidas em refrigeração até retração do coágulo. Posteriormente foram centrifugadas durante 15 minutos a 500G, acondicionadas em tubos de polipropileno<sup>4</sup> e armazenadas à -20°C para futura análise. As amostras contendo EDTA foram utilizadas para realização do hemograma e esfregaço sanguíneo, logo após a colheita.

### 4.3.3 Hemograma

A contagem de leucócitos, hemácias e os índices hematimétricos foram realizadas em contador semi-automático<sup>5</sup>. As contagens diferenciais de glóbulos brancos foram feitas com auxílio de microscópio óptico comum, após coloração pelo corante de Rosenfeld (0,97 g de Giemsa em pó azul eosina-azul-de-metileno, Ecibra nº 0390; 0,53 g de May Gröwald eosina-azul de metileno, Ecibra nº 0747; 1000ml Metanol PA, Cinética cod. 109070).

### 4.3.4 Bioquímica Sérica

A avaliação da função hepática foi realizada por meio da determinação das atividades séricas de AST, (método de Reitman-Frankel), GGT, (método de Szas modificado), e CK, (método de Szas) e as leituras realizadas em espectrofotômetro

---

<sup>3</sup> Vacutainer®, BD Diagnostics - Preanalytical Systems.

<sup>4</sup> Eppendorfes®

<sup>5</sup> POCH 100 iV - DIFF. marca- SYSMEX..

semi-automático (Labquest, Belo Horizonte), com comprimento de onda específico para cada constituinte.

A proteína total sérica foi determinada pelo método do biureto empregando-se *kit* comercial<sup>6</sup>. A separação das frações protéicas foi realizada por meio de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970). Após fracionamento o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de coomassie (0,25%). Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas (ver apêndice). As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado<sup>7</sup>. Como referência foi utilizada uma solução marcadora<sup>8</sup> com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (D), além das proteínas purificadas<sup>3</sup> transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina,  $\alpha_1$ -antitripsina e IgG.

#### **4.3.5 Avaliação ultrassonográfica e biópsia hepática percutânea**

A avaliação ultrassonográfica e posterior biópsia hepática foram realizadas entre o 8° e 11° espaços intercostais do antímero direito. Em todos os animais foi realizada uma varredura nos sentidos caudo-craneal e dorso-ventral, onde foi avaliado a ecogenicidade do parênquima hepático padrão ultrassonográfico hepático foi considerado normal quando o fígado apresentava-se no interior do gradil costal, com contornos lisos e margens de ângulos agudos, com ecotextura homogênea, levemente mais grosseira que aquela do parênquima esplênico e, com ecogenicidade igual ou discretamente maior que a do córtex renal e menor que a do baço e a do ligamento falciforme (MAMPRIM, 2004). Com as imagens bidimensionais (2D) armazenadas na memória de um computador e com auxílio de "software específico" foi estabelecida a

---

<sup>6</sup> Kit comercial, Labtest, Belo Horizonte - MG

<sup>7</sup> Shimadzu, Tóquio- Japão

<sup>8</sup> Sigma, Saint Louis-USA

região de interesse (RI), com o objetivo de quantificar o número médio de pixels local na escala-cinza e assim determinar grau de ecogenicidade do fígado. Cada (RI) foi delimitada por um retângulo de 10,00 mm de altura por 5,0 mm de espessura de lados, localizado na região central no eixo central do feixe sonoro a uma profundidade de 1 a 2 cm.

Foram colhidos fragmentos hepáticos através da técnica de biópsia percutânea com agulha cortante tipo tru-cut<sup>9</sup>, para acompanhamento do processo de intoxicação induzida experimentalmente mediante avaliação ultrassonográfica e histológica. Com os animais em posição quadrupedal, uma área de 10 cm de largura por 15 cm de comprimento foi tricotomizada na região do gradil costal direito (MEDEIROS et al. 2002). Para a realização de anestesia local infiltrativa foram usados 2 ml de cloridrato de lidocaína 2,0% sem vasoconstrictor (NAVARRE & PUGH, 2005). Para este procedimento utilizou-se agulha calibre 40 x 16 para perfurar a pele e tecido subcutâneo. Em seguida foi introduzida a agulha cortante tipo tru-cut 14G que perfurou os músculos intercostais até alcançar o fígado. A agulha foi direcionada em sentido à articulação do cotovelo oposto, formando um ângulo de 90° com a pele, e com o auxílio do ultrassom foi determinada a profundidade necessária de penetração da agulha no parênquima hepático para a colheita da amostra hepática, a qual mediu aproximadamente 2,0 cm de comprimento por 3 mm de largura (NAVARRE & PUGH, 2005; MEDEIROS et al. 2002; FERREIRA et al. 1996). Os fragmentos hepáticos foram acondicionados em frascos contendo como fixador formalina a 10% neutro e tamponada, em pH 7,0 para realização dos exames histológicos.

#### **4.4. Exame histológico**

Os exames histológicos foram realizados no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal

---

<sup>9</sup> Agulha cortante tipo tru-cut 14G®



As amostras hepáticas foram fixadas por mais de 18 horas numa relação líquido material 10:1, permitindo a completa fixação, logo após foi processado conforme a rotina convencional de processamento histológico com desidratação em diluições crescentes de alcoóis e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica.

Os cortes foram realizados em micrótomo, com espessura de 3  $\mu\text{m}$  e corados pelo método histoquímico de rotina, hematoxilina e eosina (HE) segundo técnica descrita por LUNA (1968) posterior análise em microscopia de luz.

#### **4.5. Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com auxílio do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS-Versão 9.1). Os contrastes de média foram realizados pelo teste de Tukey, com 95% de confiabilidade ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental não houve morte natural dos animais. Um animal do grupo com 1,0% de inclusão de sementes (G3) no 21º dia após a inclusão (T3) começou a apresentar sinais de intoxicação como depressão, diminuição de apetite e hipomotilidade rumenal. Este animal no dia seguinte (22º dia) apresentou-se em decúbito esternal, deprimido, inapetente com hipomotilidade e timpania rumenal, fezes pastosas e pêlos eriçados. Foi suspensa a administração de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração e realizado tratamento com soro glicofisiológico a 5% e protetor hepático por três dias, obtendo-se rápida resposta do animal, que reassumiu posição quadrupedal e voltou a se alimentar normalmente. As diferentes respostas ou resistência individual dos animais aos APs podem ser reflexo da: 1) detoxificação bacteriana no trato gastrointestinal; 2) taxa de conversão, no fígado, dos APs a pirróis tóxicos e; 3) capacidade anti-oxidativa individual do animal. Este animal permaneceu dentro do experimento participando da última colheita no T4.

Os restantes dos animais não apresentaram sinais clínicos de intoxicação e o consumo da ração nas diferentes proporções de semente de *Crotalaria spectabilis* foi total ao longo de todo o período experimental. Estes resultados concordam com relato de ANJOS et al. (2010) em estudo com *Crotalaria retusa* onde os ovinos receberam a ingestão diária de 136,8 mg MCT/kg de peso corporal durante 20 dias e não apresentaram sinais clínicos. Segundo RADOSTITS et al. (2002), este fato parece decorrer da capacidade do ovino em detoxificar os APs no fígado, provavelmente relacionada à dieta consumida antes da domesticação. Pequenos ruminantes são mais seletivos quanto à ingestão de alimentos, desenvolvendo, em virtude disso, resistência às toxinas. Esta resistência dos ovinos é atribuída, também, a uma maior quantidade de microorganismos no rúmen capazes de biotransformar esses alcalóides com maior eficiência que bovinos (CRAIG et al. 1991).

### 5.1 Exame físico - clínico

Os animais submetidos a experimentação não apresentaram alterações marcantes no exame físico (Tabela 1). Quanto à temperatura retal, apresentou aumento significativo do valor médio verificado nos animais do grupo com 1,0% de inclusão de sementes (G3) quando comparado com os animais dos grupos com 0,4% (G1) e 0,6% (G2). Apesar da variação encontrada, em todos os grupos estudados a temperatura se manteve dentro do intervalo de normalidade para a espécie ovina (PUGH, 2005).

Os valores maiores das frequências cardíaca e respiratória foram observados nos animais do grupo G3 enquanto os valores menores foram constatados nos animais pertencentes ao grupo G2, porém as frequências cardíaca e respiratória apresentavam-se mais elevadas que o relatado por PUGH (2005), talvez em decorrência das diferentes condições climáticas sob as quais foi realizado este experimento.

**Tabela 1.** Médias e desvios - padrão dos parâmetros da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e da temperatura corpórea (Temp.), de ovinos alimentados com diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>FC (min)</b>	<b>FR (min)</b>	<b>Temp.(°C)</b>
G1	91,26±5,96 <sup>a</sup>	27,43±4,52 <sup>a</sup>	38,1±0,4 <sup>b</sup>
G2	89,31±5,73 <sup>a</sup>	25,64±2,24 <sup>a</sup>	38,2±0,4 <sup>b</sup>
G3	99,88±7,52 <sup>a</sup>	28,87±4,22 <sup>a</sup>	38,7±0,3 <sup>a</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Quanto à variação do peso corporal dos animais ao longo dos 28 dias de experimento (Tabela 2), foi observado aumento significativo (p<0,05) nos animais do grupo G2 em todos os tempos avaliados quando comparado com o tempo controle (T0). Da mesma forma houve ganho de peso (p<0,05) nos animais do grupo G3 a partir dos 21° e 28° dias (T3 e T4), discordando com o descrito por NOBRE et al.(2004), em intoxicação de equinos por *C. retusa* e com Souza et al. (1997), em intoxicação experimental de suínos com sementes de *C. spectabilis*.

**Tabela 2.** Médias e desvios-padrão do peso corporal (kg) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

Grupo	T0	T1	T2	T3	T4
G1	49,66±5,72 <sup>aA</sup>	50,14±6,45 <sup>aA</sup>	50,02±6,39 <sup>aA</sup>	50,84±6,44 <sup>aA</sup>	50,92±6,43 <sup>aA</sup>
G2	42,46±7,11 <sup>abA</sup>	45,92±5,76 <sup>abB</sup>	46,28±6,20 <sup>abB</sup>	47,14±6,26 <sup>abB</sup>	47,20±6,41 <sup>abB</sup>
G3	34,88±6,22 <sup>bA</sup>	35,40±4,99 <sup>bA</sup>	36,50±4,42 <sup>bAB</sup>	37,28±5,24 <sup>bB</sup>	38,14±5,02 <sup>bB</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. Hematologia

### 5.2.1 Leucograma

O número de leucócitos não variou ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais e também em função dos tempos, durante todo o período experimental, estando dentro da faixa de normalidade citada por PUGH (2005) para a espécie ovina (Tabela 3).

**Tabela 3.** Médias e desvios-padrão da contagem total de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) no sangue de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

Grupo	T0	T1	T2	T3	T4
G1	8,76±2,19 <sup>aA</sup>	10,00±3,03 <sup>aA</sup>	8,38±2,40 <sup>aA</sup>	7,38±1,46 <sup>aA</sup>	7,43±3,33 <sup>aA</sup>
G2	10,10±1,81 <sup>aA</sup>	9,68±2,04 <sup>aA</sup>	7,26±0,67 <sup>aA</sup>	8,48±0,74 <sup>aA</sup>	8,06±0,85 <sup>aA</sup>
G3	10,42±1,52 <sup>aA</sup>	8,80±1,65 <sup>aA</sup>	11,64±5,16 <sup>aA</sup>	9,56±2,69 <sup>aA</sup>	9,10±1,85 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O número total de **linfócitos** (Tabela 4) aumento a ( $p < 0,05$ ) G3 em relação aos grupos G1 e G2 no tempo controle (T0) e entre os tempos. No entanto estes valores permaneceram dentro da normalidade preconizada por PUGH (2002).

**Tabela 4.** Médias e desvios - padrão da contagem total de linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	3,91 $\pm$ 0,99 <sup>ba</sup>	3,65 $\pm$ 1,60 <sup>aA</sup>	4,05 $\pm$ 1,72 <sup>aA</sup>	4,62 $\pm$ 1,56 <sup>aA</sup>	3,84 $\pm$ 0,36 <sup>aA</sup>
G2	3,34 $\pm$ 0,31 <sup>ba</sup>	4,08 $\pm$ 1,24 <sup>aA</sup>	3,44 $\pm$ 0,95 <sup>aA</sup>	3,91 $\pm$ 1,23 <sup>aA</sup>	3,75 $\pm$ 0,47 <sup>aA</sup>
G3	6,85 $\pm$ 0,90 <sup>aA</sup>	5,25 $\pm$ 0,92 <sup>aAB</sup>	4,36 $\pm$ 1,64 <sup>aB</sup>	4,21 $\pm$ 1,02 <sup>aB</sup>	3,28 $\pm$ 1,43 <sup>aB</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As contagens do número total de neutrófilos segmentados (Tabela 5) apresentaram aumento significativo no G2, quando comparado ao grupo com a maior porcentagem de inclusão de sementes na ração, G3, ambos no tempo controle (T0). Da mesma forma, foi constatada diferença ( $p < 0,05$ ) entre o grupo com 0,4% de inclusão de sementes, G1, e o grupo com 1,0% de inclusão, G3, aos 7 dias após inclusão de sementes na ração, T1. Ainda, foi verificada diferença significativa entre todos os tempos avaliados no G1. No entanto, apesar das variações significativas observadas, todos os valores mantiveram-se dentro da normalidade, segundo PUGH (2005).

**Tabela 5.** Médias e desvios - padrão da contagem total de neutrófilos segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	4,12 $\pm$ 1,2 <sup>abAB</sup>	6,09 $\pm$ 1,6 <sup>aA</sup>	3,80 $\pm$ 0,7 <sup>aAB</sup>	2,28 $\pm$ 0,4 <sup>aB</sup>	3,13 $\pm$ 1,1 <sup>aAB</sup>
G2	6,25 $\pm$ 1,8 <sup>aA</sup>	5,04 $\pm$ 2,1 <sup>abA</sup>	3,59 $\pm$ 0,9 <sup>aA</sup>	4,04 $\pm$ 0,7 <sup>abA</sup>	4,11 $\pm$ 0,8 <sup>aA</sup>
G3	2,15 $\pm$ 1,1 <sup>ba</sup>	3,14 $\pm$ 0,8 <sup>ba</sup>	3,54 $\pm$ 1,5 <sup>aA</sup>	4,99 $\pm$ 3,0 <sup>ba</sup>	3,29 $\pm$ 1,4 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5.2.2 Eritrograma

De forma geral, foi observada em todos os animais uma discreta queda na média do número de eritrócitos ao longo do período experimental, sem evidenciar no entanto,

diferença significativa entre eles. Os valores permaneceram dentro do intervalo considerado fisiológico para a espécie ovina (Tabela 6). Somente no grupo com maior proporção de sementes incluídas na ração, G3, no último dia experimental (T4) foi observado uma média abaixo da normalidade. Este resultado provavelmente é decorrente do fato de uma das ovelhas, neste período, ter apresentado contagem de hemácias inferior ao normal ( $7,36 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), quadro este compatível com anemia.

**Tabela 6.** Médias e desvios - padrão do número de eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) no sangue de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	9,96±0,46 <sup>aA</sup>	10,15±0,73 <sup>aA</sup>	11,42±1,06 <sup>aA</sup>	11,01±1,08 <sup>aA</sup>	10,44±0,87 <sup>aA</sup>
G2	10,20±1,55 <sup>aA</sup>	9,74±1,27 <sup>aA</sup>	9,46±1,18 <sup>aA</sup>	9,84±1,77 <sup>aA</sup>	9,26±1,40 <sup>aA</sup>
G3	9,75±1,62 <sup>aA</sup>	9,90±1,75 <sup>aA</sup>	10,08±1,65 <sup>aA</sup>	9,14±1,42 <sup>aA</sup>	8,64±0,94 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Com relação aos valores médios de volume globular (Tabela 7) ao longo do período experimental nenhum dos animais apresentou alteração ou diferença significativa entre eles, mantendo-se dentro da normalidade, resultados estes compatíveis com os descritos por PUGH (2005).

**Tabela 7.** Médias e desvios - padrão do volume globular (%) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	27,84±3,28 <sup>aA</sup>	28,56±3,89 <sup>aA</sup>	32,46±4,25 <sup>aA</sup>	31,06±4,34 <sup>aA</sup>	29,18±3,64 <sup>aA</sup>
G2	30,38±5,55 <sup>aA</sup>	29,08±4,31 <sup>aA</sup>	27,88±2,87 <sup>aA</sup>	28,78±4,66 <sup>aA</sup>	27,50±3,80 <sup>aA</sup>
G3	28,78±4,85 <sup>aA</sup>	29,08±4,90 <sup>aA</sup>	29,38±4,16 <sup>aA</sup>	26,68±4,36 <sup>aA</sup>	25,20±3,13 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Quanto ao teor de hemoglobina (Tabela 8) não se constatou diferença significativa entre os grupos ou entre os tempos estudados, mantendo-se dentro dos valores preconizados por PUGH (2005). Somente no grupo G3 no 28º dia (T4) foi verificado valor abaixo da normalidade, possivelmente ao fato de uma das ovelhas apresentar um quadro compatível com anemia a partir da segunda semana do experimento.

**Tabela 8.** Médias e desvios - padrão do teor de hemoglobina (g/dL) no sangue de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	8,82±0,49 <sup>aA</sup>	9,07±0,76 <sup>aA</sup>	10,18±0,84 <sup>aA</sup>	9,77±0,79 <sup>aA</sup>	9,28±0,59 <sup>aA</sup>
G2	9,34±1,02 <sup>aA</sup>	9,00±0,81 <sup>aA</sup>	8,55±0,69 <sup>aA</sup>	8,89±1,23 <sup>aA</sup>	8,46±0,98 <sup>abA</sup>
G3	8,53±1,13 <sup>aA</sup>	8,72±1,22 <sup>aA</sup>	8,92±1,13 <sup>aA</sup>	8,02±1,06 <sup>aA</sup>	7,68±0,70 <sup>bA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

### 5.3. Perfil bioquímico

#### 5.3.1. Enzimas

Quanto à atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) (Tabela 9), foi verificado aumento significativo no grupo G2 quando comparado com o grupo G1 no tempo controle (T0) e um pico nas concentrações séricas desta enzima aos 7 dias de consumo da semente (T1) no grupo com a menor proporção de sementes incluída na ração, G1. No entanto, os valores permaneceram dentro da normalidade durante todo o período experimental, provavelmente em decorrência do fato de as lesões hepáticas observadas não terem sido suficientes para induzir aumento da atividade sérica de GGT, situação que indica lesão hepática e disfunção biliar segundo TENNANT (1997).

**Tabela 9.** Médias e desvios - padrão da atividade sérica da enzima gamaglutamiltransferase (U/L) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	33,6±25,8 <sup>bA</sup>	59,6±8,9 <sup>aB</sup>	45,9±15,3 <sup>aAB</sup>	47,3±15,4 <sup>aAB</sup>	39,7±14,8 <sup>aAB</sup>
G2	67,3±14,8 <sup>aA</sup>	65,7±7,8 <sup>aA</sup>	58,1±7,8 <sup>aA</sup>	59,6±8,9 <sup>aA</sup>	70,3±18,9 <sup>aA</sup>
G3	61,2±8,3 <sup>abA</sup>	68,8±16,0 <sup>aA</sup>	65,7±10,3 <sup>aA</sup>	61,2±16,7 <sup>aA</sup>	62,7±16,3 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Quanto à atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, estando as médias dentro da normalidade citada por KRAMER et al. (1997). Entretanto, foi verificado no grupo G1 que no 21º e 28º dias do estudo, T3 e T4 respectivamente, houve diminuição na atividade sérica desta enzima. É provável que a função hepática dos ovinos intoxicados por *C. spectabilis* não tenha sido afetada em grau de severidade suficiente



para aumentar a atividade sérica de AST, apesar da constatação de degeneração hidrópica de hepatócitos.

**Tabela 10.** Médias e desvios - padrão da atividade sérica da enzima aspartato aminotransferase (U/L) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	98,47±35,5 <sup>aA</sup>	95,34±25,3 <sup>aA</sup>	84,84±28,1 <sup>aA</sup>	62,85±25,4 <sup>aA</sup>	68,09±31,0 <sup>aA</sup>
G2	82,76±11,1 <sup>aA</sup>	85,90±6,4 <sup>aA</sup>	82,76±13,8 <sup>aA</sup>	95,34±17,9 <sup>aA</sup>	91,14±20,5 <sup>aA</sup>
G3	102,66±31,0 <sup>aA</sup>	82,76±15,6 <sup>aA</sup>	96,39±21,3 <sup>aA</sup>	89,14±25,2 <sup>aA</sup>	88,01±28,2 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A atividade sérica de creatina fosfoquinase (CK) (Tabela 11) não variou (p<0,05) entre os grupos ou entre os tempos experimentais, à exceção de um animal do grupo G1 e outro do grupo G3 que apresentaram marcante elevação na atividade sérica desta enzima. THRALL et al. (2007) consideram que a CK é uma enzima de extravasamento e que sua elevação no soro sanguíneo é considerada indicador de lesão muscular. Outros pesquisadores indicaram diversos fatores que induzem a elevação desta enzima no soro sanguíneo de animais, dentre os quais se destacam esforço físico prolongado durante o transporte ou o parto, injeção intramuscular e decúbito (SOUZA et al. 1998; BIRGEL JUNIOR et al. 2003). Já que nos animais avaliados neste estudo não houve nenhuma situação parecida com a supracitada que pudesse justificar a elevação verificada na atividade sérica de CK, supõe-se que essa elevação seja decórrente de artefato de leitura, em função da termosensibilidade desta enzima, uma vez que as amostras sanguíneas colhidas durante todo o experimento foram submetidas a descanso por cerca de 40 minutos para retração do coágulo antes de centrifugação e para separação da alíquota de amostra sérica.

**Tabela 11.** Médias e desvios - padrão da atividade sérica da enzima creatina fosfoquinase (U/L) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	77,7±54,0 <sup>aA</sup>	106,8±36,3 <sup>aA</sup>	92,2±35,7 <sup>aA</sup>	68,0±23,7 <sup>aA</sup>	68,0±41,7 <sup>aA</sup>
G2	111,7±24,7 <sup>aA</sup>	106,8±24,7 <sup>aA</sup>	111,7±19,4 <sup>aA</sup>	126,2±18,1 <sup>aA</sup>	189,0±174,2 <sup>aA</sup>
G3	131,1±32,9 <sup>aA</sup>	121,4±21,7 <sup>aA</sup>	121,4±21,7 <sup>aA</sup>	131,1±64,4 <sup>aA</sup>	126,2±60,2 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Quanto à concentração sérica de proteína total (Tabela 12), não se constatou diferença (p<0,05) entre grupos ou entre os tempos durante todo o período experimental.

**Tabela 12.** Médias e desvios - padrão da concentração sérica de proteína total (g/dL) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	7,51±3,12 <sup>aA</sup>	7,33±3,64 <sup>aA</sup>	7,77±1,17 <sup>aA</sup>	7,80±3,15 <sup>aA</sup>	8,06±0,68 <sup>aA</sup>
G2	6,67±0,60 <sup>aA</sup>	7,65±0,73 <sup>aA</sup>	7,97±0,85 <sup>aA</sup>	7,62±0,76 <sup>aA</sup>	7,11±0,40 <sup>aA</sup>
G3	7,44±1,18 <sup>aA</sup>	7,14±0,49 <sup>aA</sup>	7,28±0,44 <sup>aA</sup>	7,56±0,57 <sup>aA</sup>	7,68±0,88 <sup>aA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Quanto à concentração sérica de albumina (Tabela 13), foram observados maiores valores médios nos animais dos grupos G1 e G3 aos 14 dias de inclusão de sementes (T2) com posterior decréscimo. Já no grupo G2 foi verificado um pico nas concentrações séricas desta proteína aos 21 dias de consumo da semente (T3), com posterior decréscimo.

**Tabela 13.** Médias e desvios - padrão da concentração sérica de albumina (g/dL) de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
G1	2,32±0,03 <sup>aA</sup>	2,33±0,10 <sup>aA</sup>	2,71±0,28 <sup>aAB</sup>	2,68±0,26 <sup>aAB</sup>	2,76±0,26 <sup>aB</sup>
G2	2,19±0,28 <sup>aA</sup>	2,31±0,18 <sup>aA</sup>	2,32±0,15 <sup>aA</sup>	2,60±0,33 <sup>aA</sup>	2,52±0,24 <sup>bA</sup>
G3	2,16±0,11 <sup>aA</sup>	2,27±0,16 <sup>aAB</sup>	2,60±0,21 <sup>aB</sup>	2,26±0,27 <sup>aAB</sup>	2,20±0,26 <sup>bA</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Proteinograma sérico

O proteinograma em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) possibilitou a detecção de 31 proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 17,188 a 263,025 para o grupo G1; de 17,170 a 268,688 para o G2; de 17,023 a 273,992 para o G3. Destas, sete proteínas são de importância diagnóstica: imunoglobulina A, ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulina G (IgG), haptoglobina, e  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (Tabela 14 e Figuras 13 a 19). Os pesos moleculares foram: IgA,  $82,44 \pm 41,30$ ; ceruloplasmina,  $37,21 \pm 8,05$ ; transferrina,  $484,66 \pm 16,45$ ; albumina,  $3471,37 \pm 154,84$ ; Ig G  $2573,16 \pm 188$ ; haptoglobina  $18,69 \pm 8,24$ ;  $\alpha$ 1- glicoproteína ácida,  $23,09 \pm 0,89$ .

Quanto à concentração sérica de ceruloplasmina constatou-se um pico nas concentrações séricas aos 14 dias após início do consumo de semente (T2) nos grupos G1 e G2 com diminuição significativa aos 21 dias e mostrando posterior tendência à elevação. Por outro lado, a concentração sérica de haptoglobina oscilou durante todo o período experimental. A concentração sérica de  $\alpha$ -glicoproteína ácida evidenciou um decréscimo inicial aos 7 dias após início do consumo de semente (T1). Segundo GRUYS et al. (1994), a ceruloplasmina, a haptoglobina e a  $\alpha$ -glicoproteína ácida são consideradas proteínas de fase aguda, sintetizadas pelo fígado em resposta à citocinas inflamatórias.

Quanto às concentrações séricas de transferrina e albumina, notadamente proteínas de fase aguda negativa que diminuem suas concentrações frente à um

estímulo inflamatório (KANEKO et al. 1997; THOMAS, 2010), à exceção do grupo G3, não foi observada diminuição de suas concentrações séricas em nenhum dos grupos. É provável que a maior porcentagem de inclusão de sementes neste grupo (G3) tenha causado estímulo inflamatório suficiente no parênquima hepático para desencadear a liberação de citocinas pró-inflamatórias, provocando o declínio nas concentrações séricas dessas duas proteínas de fase aguda negativas.

Quanto à concentração sérica de IgG constatou-se inicialmente elevação sérica no grupo G3 em relação aos grupos G2 e G1, embora não tenha sido significativo, observando-se concentrações séricas estatisticamente semelhantes entre os grupos e entre os momentos avaliados durante todo o período experimental. Da mesma forma, a IgA mostrou comportamento oscilante nos três grupos, durante todo o período experimental. (Tabela 14).

#### **5.4. Exame Ultrassonográfico**

A avaliação ultrassonográfica foi realizada no antímero direito no gradil costal, entre o 8° e 11° espaços intercostais, concordando com NESPOLI et. al. (2009) mostrou que o fígado pode ser escaneado em ovinos do 8° ao 12° espaços intercostais. Esta avaliação evidenciou que com o avançar do tempo em todos os animais o fígado aumentou de tamanho e os pontos utilizados para a biopsia hepática tornaram-se cada vez mais caudais (Figura 1). No tempo controle (T0) foi avaliado como padrão ultrassonográfico de todos os animais a ecotextura homogênea, alterações na arquitetura do parênquima hepático, alterações vasculares e na ecogenicidade, coincidindo com o citado por BILLER et al. (1992). Na figura 2 se ilustra o parênquima hepático sadio e as regiões avaliadas.

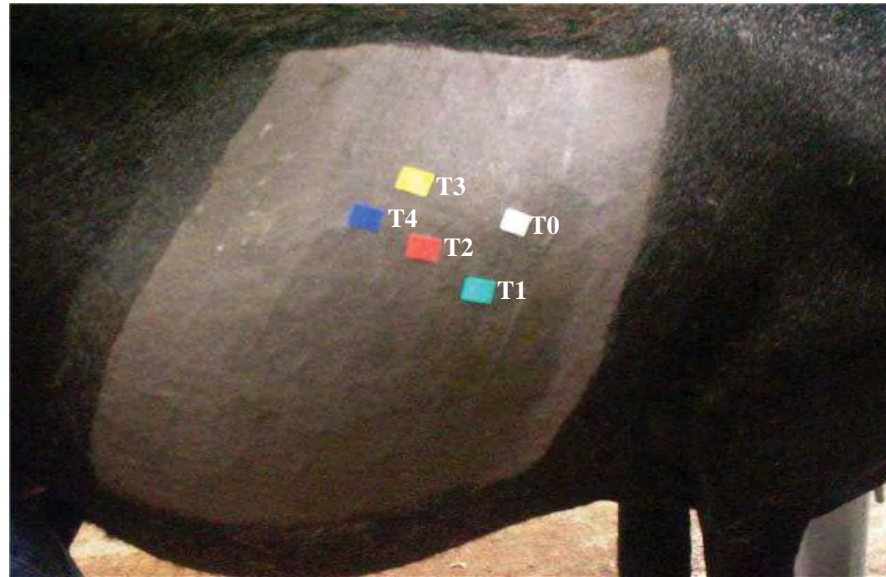
**Tabela 14.** Concentrações séricas de proteínas (médias  $\pm$  desvios-padrão (mg/dL) obtidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

<b>Proteína e Grupo</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
<b>IgA</b>					
G1	157,88 $\pm$ 60,6 <sup>aA</sup>	82,29 $\pm$ 54,9 <sup>aA</sup>	56,08 $\pm$ 40,5 <sup>abA</sup>	74,94 $\pm$ 45,5 <sup>abA</sup>	82,12 $\pm$ 47,1 <sup>aA</sup>
G2	62,67 $\pm$ 26,3 <sup>aA</sup>	36,7 $\pm$ 51,2 <sup>aAB</sup>	88,94 $\pm$ 54,9 <sup>abB</sup>	77,36 $\pm$ 27,0 <sup>aAB</sup>	83,20 $\pm$ 31,0 <sup>aAB</sup>
G3	144,05 $\pm$ 47,8 <sup>aA</sup>	81,97 $\pm$ 28,2 <sup>aA</sup>	35,84 $\pm$ 13,3 <sup>bA</sup>	27,31 $\pm$ 9,8 <sup>bA</sup>	54,12 $\pm$ 21,5 <sup>aA</sup>
<b>Ceruloplasmina</b>					
G1	56,63 $\pm$ 18,0 <sup>aA</sup>	42,82 $\pm$ 16,6 <sup>aA</sup>	75,64 $\pm$ 18,6 <sup>aA</sup>	32,48 $\pm$ 12,9 <sup>aA</sup>	40,70 $\pm$ 9,5 <sup>aA</sup>
G2	33,83 $\pm$ 12,2 <sup>aA</sup>	21,2 $\pm$ 24,7 <sup>aA</sup>	39,36 $\pm$ 21,2 <sup>aA</sup>	33,57 $\pm$ 17,4 <sup>aA</sup>	32,95 $\pm$ 11,2 <sup>aA</sup>
G3	41,22 $\pm$ 9,5 <sup>aA</sup>	35,29 $\pm$ 4,6 <sup>aA</sup>	18,13 $\pm$ 10,0 <sup>bA</sup>	23,06 $\pm$ 6,0 <sup>aA</sup>	28,94 $\pm$ 7,5 <sup>bA</sup>
<b>Transferrina</b>					
G1	546,13 $\pm$ 74,7 <sup>aA</sup>	527,21 $\pm$ 91,6 <sup>aA</sup>	568,01 $\pm$ 109 <sup>aA</sup>	540,92 $\pm$ 80,7 <sup>aA</sup>	496,79 $\pm$ 95,8 <sup>aA</sup>
G2	429,05 $\pm$ 161,4 <sup>aA</sup>	446,3 $\pm$ 94,8 <sup>aA</sup>	477,435 $\pm$ 136 <sup>aA</sup>	451,23 $\pm$ 99,3 <sup>aA</sup>	450,80 $\pm$ 76,7 <sup>aA</sup>
G3	543,98 $\pm$ 149,9 <sup>aA</sup>	462,39 $\pm$ 79,3 <sup>aA</sup>	437,44 $\pm$ 104,1 <sup>aA</sup>	448,25 $\pm$ 61,1 <sup>aA</sup>	508,15 $\pm$ 118,4 <sup>aA</sup>
<b>Albumina</b>					
G1	3761,6 $\pm$ 289,0 <sup>aA</sup>	3591,3 $\pm$ 301,9 <sup>aA</sup>	4199,3 $\pm$ 1422 <sup>aA</sup>	4102,9 $\pm$ 699 <sup>aA</sup>	3820,4 $\pm$ 538 <sup>aA</sup>
G2	2669,8 $\pm$ 443,4 <sup>aA</sup>	2997,9 $\pm$ 684,9 <sup>aA</sup>	3578,2 $\pm$ 938 <sup>aA</sup>	3566,4 $\pm$ 583 <sup>aA</sup>	3434,3 $\pm$ 375 <sup>aA</sup>
G3	3445,1 $\pm$ 320,1 <sup>aA</sup>	2659,4 $\pm$ 375,6 <sup>aA</sup>	3271,0 $\pm$ 398 <sup>aA</sup>	3513,2 $\pm$ 465 <sup>aA</sup>	3900,0 $\pm$ 414 <sup>aA</sup>
<b>Ig G</b>					
G1	1848,0 $\pm$ 516,5 <sup>aA</sup>	1735,4 $\pm$ 599,0 <sup>aA</sup>	1760,8 $\pm$ 481,9 <sup>aA</sup>	1836,5 $\pm$ 408 <sup>aA</sup>	1855,4 $\pm$ 242 <sup>aA</sup>
G2	1551,9 $\pm$ 542,6 <sup>aA</sup>	1614,6 $\pm$ 152,4 <sup>aA</sup>	1665,4 $\pm$ 358,8 <sup>aA</sup>	1745,4 $\pm$ 199 <sup>aA</sup>	1634,6 $\pm$ 114 <sup>aA</sup>
G3	2052,5 $\pm$ 291,7 <sup>aA</sup>	1662,7 $\pm$ 290,8 <sup>aA</sup>	1553,4 $\pm$ 117,6 <sup>aA</sup>	1630,6 $\pm$ 244 <sup>aA</sup>	1523,7 $\pm$ 277 <sup>aA</sup>
<b>Haptoglobina</b>					
G1	20,3 $\pm$ 6,4 <sup>aA</sup>	22,5 $\pm$ 7,4 <sup>aA</sup>	24,5 $\pm$ 6,0 <sup>aA</sup>	21,9 $\pm$ 2,4 <sup>aA</sup>	20,4 $\pm$ 13,2 <sup>aA</sup>
G2	11,9 $\pm$ 2,3 <sup>aA</sup>	24,0 $\pm$ 8,9 <sup>aA</sup>	18,6 $\pm$ 8,0 <sup>aA</sup>	20,8 $\pm$ 11,8 <sup>aA</sup>	12,9 $\pm$ 8,1 <sup>aA</sup>
G3	19,6 $\pm$ 8,7 <sup>aA</sup>	17,4 $\pm$ 4,5 <sup>aA</sup>	27,2 $\pm$ 7,6 <sup>aA</sup>	21,7 $\pm$ 10,3 <sup>aA</sup>	28,8 $\pm$ 15,1 <sup>aA</sup>
<b><math>\alpha</math>1- glicoproteína ácida</b>					
G1	64,9 $\pm$ 32,4 <sup>aA</sup>	25,9 $\pm$ 8,4 <sup>aA</sup>	36,7 $\pm$ 9,9 <sup>aA</sup>	19,0 $\pm$ 6,4 <sup>aA</sup>	16,8 $\pm$ 9,8 <sup>aA</sup>
G2	56,0 $\pm$ 31,7 <sup>aA</sup>	19,1 $\pm$ 6,1 <sup>aA</sup>	14,5 $\pm$ 10,4 <sup>aA</sup>	14,6 $\pm$ 16,2 <sup>aA</sup>	12,0 $\pm$ 3,2 <sup>aA</sup>
G3	16,1 $\pm$ 5,0 <sup>aA</sup>	11,1 $\pm$ 1,3 <sup>aA</sup>	17,5 $\pm$ 39,1 <sup>aA</sup>	13,8 $\pm$ 22,7 <sup>aA</sup>	25,1 $\pm$ 10,4 <sup>aA</sup>

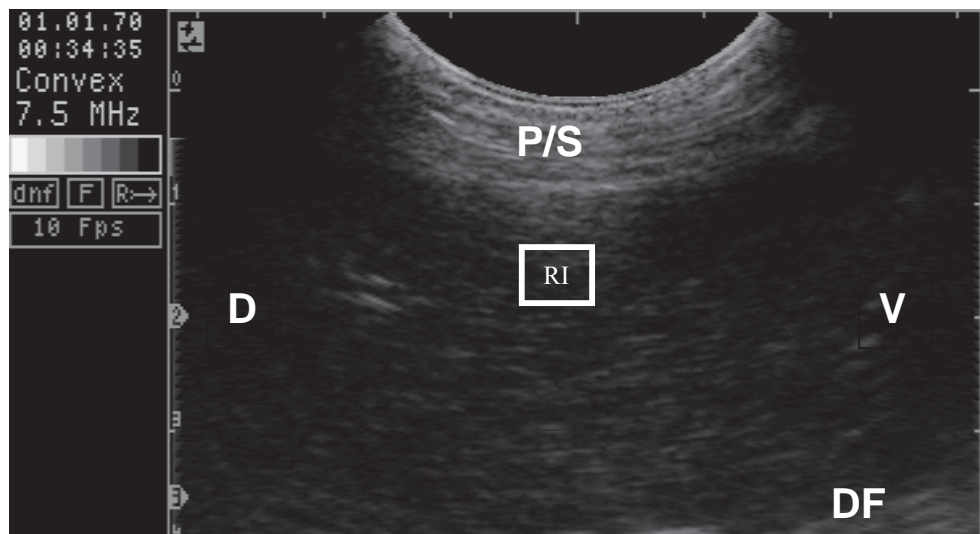
Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma foi observada uma alteração na estrutura do parênquima hepático em todos os animais a partir dos 7 dias após o início da inclusão de sementes na ração (T1), tornando-se mais severos com o avançar do experimento, sendo mais marcantes no grupo com maior porcentagem de sementes, grupo G3. Fato esse explicado por CULLEN & MacLACHLAN (2001) onde relatam que o fígado recebe produtos e toxinas do trato gastrintestinal pelo fluxo sanguíneo portal, doenças intestinais primárias que lesam a mucosa podem causar aumento da absorção dessas substâncias pela circulação portal. Estas substâncias podem causar lesão hepática (hepatopatia tóxica) ou incitar reações imunológicas que levam ao desenvolvimento de um processo inflamatório. Foi possível visualizar estas alteração por meio da alteração na ecogenicidade das imagens, que mostraram-se cada vez mais hipoecogênicas em consequência do grau de congestão hepática. O fígado hipoecogênico está associado às afecções que levam ao acúmulo de líquido em hepatócitos, tais como hepatite aguda, colangiohepatite, congestão passiva, além de necrose hepática (BILLER et al. 1992; BOROFFKA, 1998). Ainda, foi possível acompanhar a dilatação da veia porta (Figura 3).

Mediante os resultados de patologia clínica e sinais clínicos não conclusivos neste estudo, é de vital importância a avaliação ultrassonográfica e a utilização de biópsia hepática guiada por ultrassom para uso diagnóstico de hepatopatias em ovinos como o relatado por Braun (1996). O exame histológico com amostras obtidas por biópsias é essencial para o estabelecimento de diagnósticos e prognósticos precisos (Bunch et al. 1985) e a formulação de terapias específicas. Além disso, a colheita de amostras seriadas de tecido é uma alternativa importante para a investigação histológica de doenças tóxicas.

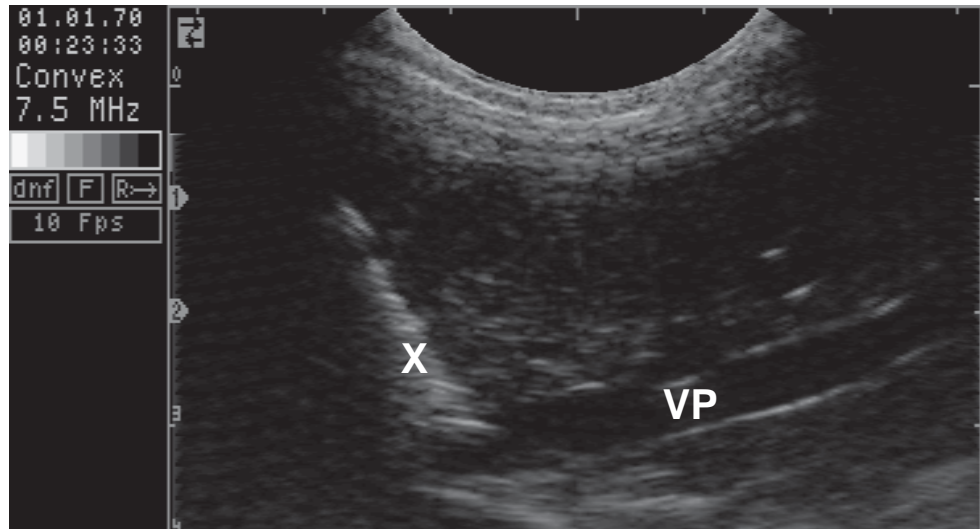


**Figura 1.** Diferentes pontos de realização da biópsia hepática, em função do tempo de administração de sementes de *C. spectabilis* na ração.



**Figura 2.** Ultrassonograma do parênquima hepático de ovino do G2 no tempo controle (T0), ilustrando a região de interesse (RI), onde é verificado o grau de congestão hepática através da quantificação do número de pixels. Regiões dorsal (D) e ventral (V) do animal, região de pele e tecido subcutâneo (P/S), região diafragmática (DF).





**Figura 3.** Ultrasonograma em plano transversal do parênquima hepático de ovino do grupo G3 no 14º dia após inclusão das sementes (T2), mostrando a dilatação da veia porta (VP), congestão hepática (C), hiperecogenicidade decorrente do efeito de reverberação do eco no momento do disparo.

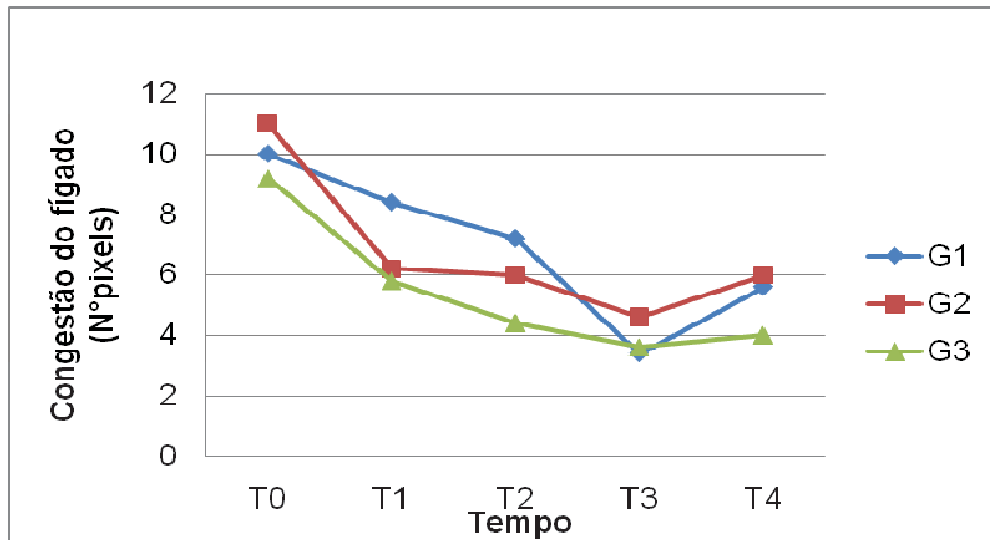
Quanto ao número de pixels (Tabela 15 e Figura 4), constatou-se diminuição progressiva significativa nos três grupos estudados, durante todo o período experimental, sendo menor no grupo com menor porcentagem de sementes na ração (G1). Demonstrando assim um aumento na congestão hepática. Segundo a literatura (BILLER et al. 1992; ZWEIBEL, 1995), uma diminuição difusa da ecogenicidade pode estar correlacionado a processos inflamatórios ou congestivos, sendo compatível com os achados neste estudo.



**Tabela 15.** Médias e desvios-padrões do grau de número de pixels de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração, UNESP – Jaboticabal, 2010.

Grupo	T0	T1	T2	T3	T4
G1	10±7 <sup>aAC</sup>	8,4±11,2 <sup>aA</sup>	7,2±5,2 <sup>aAC</sup>	3,4±2,8 <sup>aBC</sup>	5,6±6,4 <sup>aC</sup>
G2	11±6 <sup>aA</sup>	6,2±5 <sup>bAB</sup>	6±3,8 <sup>aAB</sup>	4,6±3,8 <sup>aB</sup>	6±3,8 <sup>aB</sup>
G3	9,2±8 <sup>aA</sup>	5,8±7 <sup>bAB</sup>	4,4±2,8 <sup>aAB</sup>	3,6±2,6 <sup>aB</sup>	4±2,6 <sup>aB</sup>

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Representação gráfica do número de pixels de ovinos em função do tempo de inclusão de diferentes concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração.

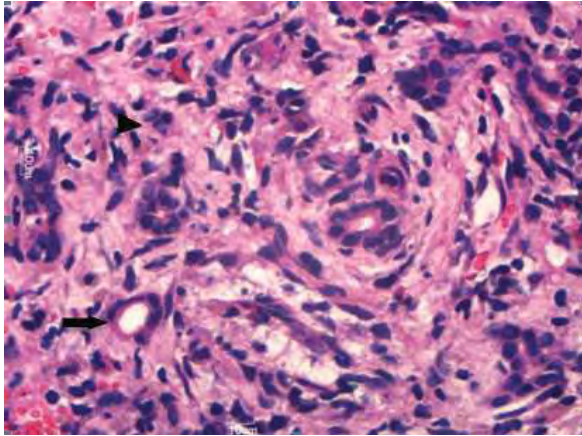
### 5.5. Exame Histológico

Os achados histológicos são mostrados nas figuras 5 a 8. Os achados mais frequentes nos cortes histológicos do fígado dos ovinos do grupo G1 não evidenciaram alterações no tempo controle, aos 7 e 14 dias do consumo de sementes, T1 e T2 respectivamente. Já aos 21 e 28 dias (T3 e T4) após a inclusão de sementes, os animais apresentaram discretas alterações no fígado, como degeneração hidrópica

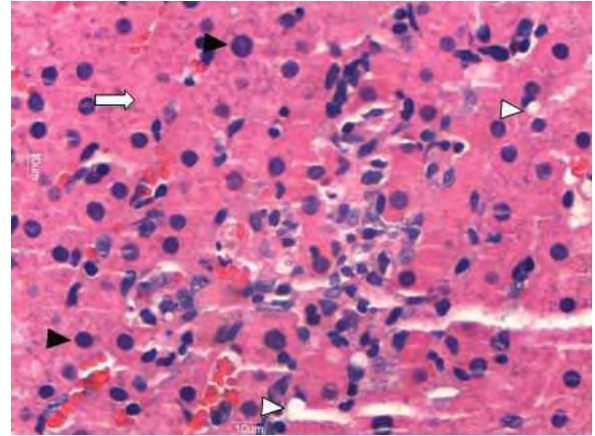
difusa, infiltrado polimorfonuclear multifocal, degeneração gordurosa difusa, infiltrado mononuclear multifocal e centro-lobular.

No grupo com 0,6 % de sementes, G2, evidenciou-se durante os cinco momentos avaliados, uma discreta degeneração hidrópica difusa, infiltrado inflamatório polimorfonuclear de apresentação multifocal e degeneração gordurosa difusa e multifocal. Destaca-se que em um animal do G2 no T1 foi observado um infiltrado polimorfonuclear periportal acentuado, proliferação dos ductos biliares com fibrose e moderada necrose multifocal (Figura 5). Achados estes compatíveis com o descrito por DANTAS et al. (2004), na intoxicação crônica espontânea por *C. retusa* em ovinos, que observaram fibrose periportal e proliferação de ductos biliares. Lemos & Barros (1998) em bovinos, Nobre et al (2004) na intoxicação por *C. retusa* em eqüídeos e Nobre et al (2005) na intoxicação por *C. retusa* em ovinos descreveram que existem diversos padrões de degeneração e necrose dos hepatócitos.

Neste mesmo G2 aos 14 dias de consumo das sementes (T2) foi observado apenas em um animal infiltrado inflamatório polimorfonuclear moderado, degeneração gordurosa, grandes áreas de necrose multifocal moderada, com infiltrado inflamatório polimorfo e mononuclear multifocal difuso (Figura 6), concordando com os achados descritos por ILHA et al (2001) na ocorrência de um surto de intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* em ovinos, que incluem graus variáveis de degeneração hepatocelular caracterizada pelo acúmulo de numerosas gotas lipídicas no citoplasma das células hepáticas e presença de lisossomos carregados de material eletrodense que, na maioria dos casos, correspondem à lipofuscina-ceróide.



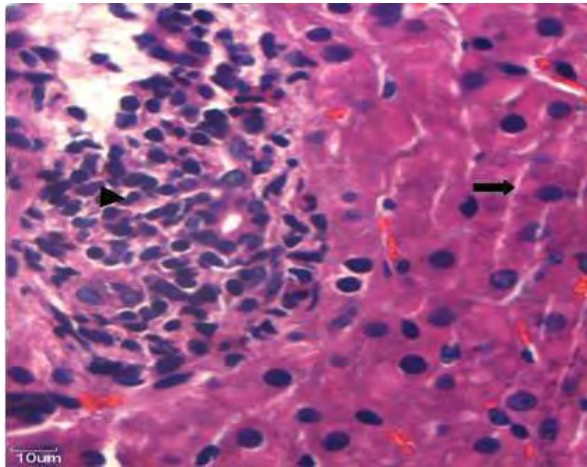
**Figura 5.** Fotomicrografia do fígado de ovino do G2 no 7º dia de intoxicação (T1), ilustrando a presença de infiltrado polimorfonuclear periportal acentuado (cabeça da seta negra), proliferação dos ductos biliares com fibrose (seta negra). Coloração HE aumento de 400X.



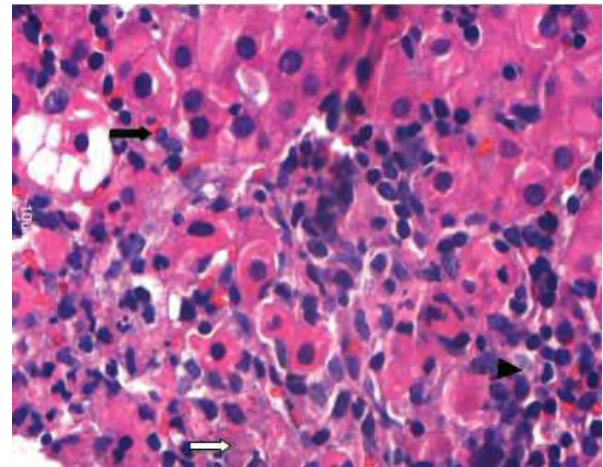
**Figura 6.** Fotomicrografia de ovino G2 no 14º dia de intoxicação (T2), ilustrando a presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (cabeça da seta negra), degeneração gordurosa difusa discreta (cabeça da seta branca), uma grande área de necrose multifocal moderada (seta branca). Coloração HE, aumento de 400X.

No grupo com maior inclusão de sementes grupo G3, em um ovino no T2, constatou-se infiltrado inflamatório mononuclear periportal acentuado, multifocal moderado e necrose multifocal discreta (Figura 7), diferindo do encontrado por Nobre et al (2005), que relataram lesões histológicas no fígado caracterizadas por necrose centrolobular.

Todos os animais dos grupos experimentais, excetuando-se os dos tempos controle, apresentaram algum tipo de infiltrado inflamatório mononuclear ou polimorfonuclear e degeneração hidrópica (Figura 8), caracterizando inflamação do parênquima hepático.



**Figura 7.** Fotomicrografia de ovino do G3 no 14º dia de intoxicação (T2), ilustrando a presença de infiltrado inflamatório mononuclear acentuado (cabeça da seta), e polimorfonuclear multifocal discreto (seta negra), área de necrose (seta branca). Coloração HE, aumento de 400X.



**Figura 8.** Fotomicrografia de ovino do G3 no 14º dia de intoxicação (T2), ilustrando a presença de infiltrado inflamatório mononuclear periportal acentuado (cabeça da seta), degeneração hidrópica (seta negra). Coloração HE, aumento de 400X.

Nobre et al (2004), Nobre et al (2005), Boghossian et al (2007) e Souza et al (2007) relataram a megalocitose dos hepatócitos como um achado comumente observado na intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos. Estes apresentaram citoplasma e núcleo amplos e cromatina condensada localizada na periferia do núcleo. Achado este que não foi constatado neste estudo, podendo-se sugerir que as diferentes doses e tempo de exposição ao tóxico não foram suficientes para provocar tal alteração.

## 6. CONCLUSÕES

- Os ovinos intoxicados experimentalmente com sementes de *C. spectabilis* quando trituradas e incorporadas na ração nas porcentagens de 0,2%, 04% e 0,6%, apresenta sinais clínicos leves de toxicidade.
- Hemograma e provas de função hepática não tem valor diagnóstico na intoxicação por *C.spectabilis* em ovinos, fazendo-se necessário a realização de exames complementares como a ultrassonografia e a biópsia hepática percutânea.
- As lesões hepáticas histológicas são compatíveis com hepatotoxicidade, porém não suficientes para alterar as atividades séricas das enzimas gamaglutamiltransferase, aspartato aminotransferase e creatina fosfoquinase.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALFONSO, H. A.; ANGELES-FIGUEREDO, M.; SANCHEZ, L. M.; GOMES, B. C. Intoxication due *Crotalaria retusa* and *Crotalaria spectabilis* in chickens and geese. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 35, n. 6, p. 539, 1993.
- AMORIM, R. M.; BORGES, A. S.; KUCHEMUCK, M. R.; TAKAHIRA, R. K.; ALENCAR, N. X. Bioquímica sérica e hemograma de bovinos antes e após a técnica de biópsia hepática. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 519-523, 2003.
- ANJOS, B. L.; NOBRE, V. M.; DANTAS, A. F.; MEDEIROS, R. M.; OLIVEIRA, N. T. S.; RIET-CORREIA, F. Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: acquired resistance by continuous administration of low doses. **Toxicon**, Elmsford, v. 55, n. 1, p.28-32, 2010.
- BILLER, D. S.; KANTROWITZ, B; MIYABAYASHI, T. Ultrasonography of diffuse liver disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 71-6, 1992.
- BOGHOSSIAN, M. R.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H.; Aspectos clínico - patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 149-156, 2007.
- BOROFFKA, S.A.E.B. Ultrasonography of the cranial abdomen: liver, spleen, pancreas and gastrointestinal tract. **Veterinary Quarterly**, v. 20, supplement 1, p. 81-2, 1998.
- BRAUN, U. Ultrasonographic examination of the liver and gall bladder in cows: normal findings. **Compendium continued education**. v. 18, p. s61-s73, 1996.
- BULL, L. B.; CULVENOR, C. C. J.; DICK, A. T. **The pyrrolizine alkaloids: their chemistry, pathogenicity and other biological properties**. New York: American Elsevier, 1968. 210 p.

BUNCH, S. E.; POLAK, D. M.; HORNBUCKLE, W. E. A modified laparoscopic approach for liver biopsy in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 187, n.10, p. 1032-1035,1985.

BURGUERA, J. A.; EDDS, G. T.; OSUNA, O. Influence of selenium on aflatoxin B1 or crotalaria toxicity in turkey poult. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 9, p.1714-17, 1983.

CARDINET, G. H. Skeletal muscle function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. London: Academic Press, 1997. p. 407-440.

CHEEKE P. R. A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pirrolizidine alkaloids. **Veterinary and Human Toxicology**. Manhattan, v. 36, p. 240-247, 1994.

CHEEKE, P. R.; SHULL, L. R. **Natural toxicants in feeds and poisonous plants**. Wesport: AVI Publishing, 1985. 300 p.

CLARKE, E. C. G.; CLARKE, M. L. **Garner's veterinary toxicology**. 3 ed. Baillière: Tindall and Cassel, 1967. p. 371-372.

COPPLE, B. L.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. **Toxicology**, Hamburg, v. 190, p. 155-169, 2003.

COPPLE, B. L. ; BANES, A.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Endothelial cell injury and fibrin deposition in rat liver after monocrotaline exposure. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 65, n. 2, p. 309-318, 2002.

COPPLE, B. L.; RONDELLI, C. M.; MADDOX, J. F.; HOGLEN, N. C.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Models of cell death in rat liver after monocrotaline exposure. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 77, p. 172 – 182, 2004.



CRAIG A.M.; PEARSON E.G.; MEYER C. & SCHMITZ A. Clinicopathologic studies of tansy ragwort toxicosis in ponies: sequential serum and histopathological changes. **Journal of Equine Veterinary Science**, California, v. 11, p. 261-281, 1991.

CULLEN, J.M.; MacLACHLAN, N.J. Liver, biliary system, and exocrine pancreas. In: McGAVIN, M.D.; CARLTON, W.W.; ZACHARY, J.F. **Special Veterinary Pathology**, Missouri: Mosby, p. 81-124, 2001.

DANTAS, A. F. M.; NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; JÚNIOR, G. S.; MEDEIROS, J. M., SILVA R. M. N.; SILVA, E. M. N.; ANJOS, B. L. Intoxicação crônica espontânea por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em ovinos na região do semi-árido paraibano, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 18-19.

DRIEMEIER, D. **Intoxicação experimental por Senecio oxyphyllus DC (“Compositae”) em bovinos**. 1990. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1990.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3<sup>rd</sup> ed. Iowa: Iowa State University, 1994. 300 p.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire, Muret**, v. 151, n. 7, p. 577-584, 2000.

FERREIRA, A. V.; VAN DER MERWE, H. J.; SLIPPERS, S. C. A. Technique for obtaining liver biopsies from mature sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 22, p. 89 – 92, 1996.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígdos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Jaboticabal, v. 54, n. 6, 2002.



FAGLIARI, J. J.; RIZOLLI, F. W.; SILVA, S. L.; SILVA, D. G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, v. 58, n.3. p.450-453. 2006.

FU, P. P.; YANG, Y. C.; XIA, Q.; CHOU, M. W.; CUI, Y. Y.; LIN, G. Pyrrolizidine alkaloids – tumorigenic components in chinese herbal medicines and dietary supplements. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 4, p. 198 – 211, 2002.

GORDON, A.H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. Elsevier Science Publishers, Nova York, 1975. p. 213.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Veterinary Bull*, London, v.64, n. 11, p.1009-1018, 1994.

HANUMEGOWDA, U. M.; COPPLE, B. L.; SHIBUYA, M.; MALLE, E.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Basement membrane and matrix metalloproteinases in monocrotaline-induced liver injury. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 76, p. 237-246, 2003.

HATAYDE, M. R.; SOUZA, A. C.; SANTANA, A. E. Achados bioquímicos séricos em suínos experimentalmente intoxicados por sementes de *Crotalaria spectabilis*. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 4, n.1, p. 49-56, 1998.

HATAYDE, M. R.; BERCHIERI-JUNIOR, A.; ALESSI, A. C.; CRUTARELLI, S. M. Estudo experimental sobre a intoxicação de *Gallus gallus domesticus* com sementes de *Crotalaria spectabilis*. I – Efeito em aves na fase inicial de crescimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 332-336, 1997.

HATAYDE, M. R.; ALESSI, A. C.; BERCHIERI-JUNIOR, A.; CAFÉ, M. B.; CURTARELLI, S. M. Estudo experimental sobre a intoxicação de *Gallus gallus domesticus* com sementes de *Crotalaria spectabilis*. II- Efeito em aves na fase final de

crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, v. 49, p. 239-249, 1997.

ILHA M. R. S.; LORETTI, A. P.; BARROS S. S; BARROS C. S. L. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa. Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 123-138, 2001.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

JOHNSON, A. E.; MOLYNEUX, R. J; MERRIL, G. B. Chemistry of toxic range plants. Variation in pyrrolizidine, alkaloid content of *Senecio*, *Amsinckia*, and *Crotalaria* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Califórnia, v. 33, n.1, p. 50-55, 1985.

JOLY, A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 4 ed. São Paulo: Nacional, 1977. p. 381-2. (Biblioteca Universitária, Série, 3. Ciências Rurais, 4).

KANEKO, J. J.; HARVEY, J: W., BRUSS, M: L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. 932 p.

KAY, J. M.; HEATH, D. **Crotalaria spectabilis. The pulmonary hypertension plant**. Illinois: Springfield, 1969. 220 p.

KELLY W. R. The liver and biliary system, In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY P. C; PALMER, N. (Ed.) **Pathology of domestic animals**. 4th Ed, San Diego, Academic Press, v. 2, p. 319- 404, 1993.

KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical Enzymology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. London: Academic Press, 1997. p. 303-325.

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C.; BACCHI, O. **Plantas invasoras de culturas no estado de São Paulo**. São Paulo: Hucitec, 1975, v. 2, p. 577.

LEMOS, R. A. A.; BARROS, C. S. I. Intoxicação por *Crotalaria* sp. **Principais enfermidades de bovinos de corte no Mato Grosso do Sul**. Campo Grande, 1998, p. 322-325.

LORENZI, H. **Pantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum. 1991. p. 273.

LU, Z. F.; ZAGZEBSKI, J. A.; O'BRIEN, R. T.; STEINBERG, H. Ultrasound attenuation and backscatter in the liver during prednisone administration. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 1997.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258 p.

MAEDA, K.; UTSU, M.; KIHAI, P. E. Quantification of sonographic echogenicity with greylevelhistogram width: a clinical tissue characterization. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 24, n. 2, p. 225-234, 1998.

MATTOCKS, A. R. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Nature**, v.217, p.723-28, 1968.

MEDEIROS, M. B. A.; SOUZA, F. F.; NETO, P. I. N.; COELHO K. I. R. Técnica de biópsia hepática guiada pelo ultra-som em bezerros. **Revista de educação continuada do CRMV**, São Paulo. v. 5, n. 1, p. 94 – 99, 2002.

MELO, A. A. **Intoxicação experimental em equinos com sementes de *Crotalaria spectabilis***. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 2010.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL NRC. **Nutrient requirements of poultry**. 9. ed. Washington: National Academy Press, 2007.

NAVARRE, C. B.; PUGH, D. G. Enfermidades do sistema gastrintestinal. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**, São Paulo: Roca, 2005. cap. 4, p. 77–118.

NEAL, W. M.; RUSOFF, L. L.; AHMANN, C. F. The isolation and some properties of an alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Routh. **American Chemical Society Journal**, v. 572, p. 2560-61, 1935.

NÉSPOLI, P. B.; GHELLER, V. A.; MAHECHA, G. A. B.; GODOY, D. K.; MACEDO, G. L.; BORDIN, A. I. Aspectos morfológicos da ultrassonografia hepática de ovinos, **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 333-338, 2009.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S.; HERRGESELL, E. J.; WISNER, E. R. Fígado. In: **Ultra-som: diagnóstico em pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 95-127.

NOBRE V.M.; RIET-CORREA F.; BARBOSA FILHO J.M.; DANTAS A.F.M.; TABOSA I.M.; VASCONCELOS J.S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p.132-143, 2004.

NOBRE, V. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO J. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS J. S. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, p. 347-352, 2005.

O'MAHONY, M. C. O., HEALY, A. M., HARTE, D., WALSH, K. G., TORGERSON, P. R., DOHERTY, M. L. Milk amyloid A: Correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A. **Research in Veterinary Science**. London, v. 80, n. 2, p. 155–161. 2006.

ORTOLANI, E. L. Intoxicação por cobre, selênio, zinco, cloreto e sódio. In: SPINOSA, E. S., outros autores. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008.

PIERCY, P. L.; RUSOFF, L. L. *Crotalaria spectabilis* Poisoning in Louisiana Livestock. **Journal American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v.108, n.1946, p.69-72, 1946.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 347-360.

RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Montevideo: Editorial Hemisfério Sur, Montevideo. 1993, 340 p.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogenese , sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 28, n.1, p 1-14, 2008.

SCHULTZE, A. E.; EMEIS, J. J.; ROTH, R. A. Cellular fibronectin von Willebrand factor concentrations in plasma of rats treated with monocrotaline pyrrole. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 51, n. 2, p. 187-191, 1996.

SHERLOCK, S.; DICK, R.; VAN LEENWEN, D. J. Liver biopsy today. **Journal of Hepatology**, Oxfordshire, v.1, n. 1, p. 75-85, 1984.

SOUZA, A. C.; HATAYDE, M. R. Aspectos hematológicos de suínos experimentalmente intoxicados por sementes de *Crotalaria spectabilis*. **Ensaio e Ciência**. Campo Grande, v. 2, n. 2, p. 49-70, 1998.

SOUZA, A. C.; HATAYDE, M. R.; BECHARA, G. H. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 12-18, 1997.

STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, Philadelphia, v. 11, p. 391-414, 1995.

TAYLOR, D. W.; WILSON, D. W.; LAMÉ, M. W.; DUNSTON, S. D.; JONES, A. D.; SEGALL, H. J. Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego v. 143, p. 196-204, 1997.

TENNANT, B. C. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap. 13, p. 327-349.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's: veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p. 891-898

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2000. 320p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 1979. 95 p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. **Plantas tóxicas para herbívoros no Brasil**. **Agroquímica**, v. 19, p. 20-26, 1982.

TOSTES, R. A.; BANDARRA, E. P. A biópsia hepática em cães. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, vol. 54 n. 5, p. 468-472, 2002.

WANG, P. Y.; YAN, J. FU, P. P.; CHOU, M. W. Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 155,n. 3, p. 411-420, 2005.

WILLIAMS, M. C.; MOLYNEUX, R. J. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in crotalaria seeds. **Weed Science**, Champaign, v. 35, p. 476-481, 1987.

YAN, C. C.; COOPER, R. A.; HUXTABLE, R. J. The comparative metabolism of the four pyrrolizidine alkaloids, seneciphylline, retrorsine, monocrotaline, and trichodesmine in the isolated, perfused rat liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 133, n. 2, p. 277-284, 1995.

ZWEIBEL, W. J. Sonographic diagnosis of diffuse liver disease. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 16, n. 11, p. 8-15, 1995.

## APÊNDICE

### A- SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE (SDS-PAGE)

#### GEL DE SEPARAÇÃO A 10%

- ✓ 11,9 mL de água deionizada
- ✓ 5,9 mL de Tris HCl 2 M, pH 8,8 ± 0,1
- ✓ 10,5 mL de Acrilamida/Bis (30% T / 1,87 C)
- ✓ 1,7 mL de glicerol
- ✓ 0,63 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,3 ± 0,1
- ✓ 0,63 mL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%
- ✓ 242 µL de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso
- ✓ 27 µL de TEMED

#### GEL DE EMPILHAMENTO A 4%

- ✓ 3,95 mL de água deionizada
- ✓ 0,6 mL de Tris HCl 0,617 M, pH 6,8 ± 0,1
- ✓ 1 mL de Acrilamida/Bis (30% T / 1,87% C)
- ✓ 300 µL de glicerol
- ✓ 123 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,3 ± 0,1
- ✓ 123 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%
- ✓ 60 µL de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso
- ✓ 13 µL de TEMED

#### TRIS HCl – 2 M – pH 8,9 (GEL DE CORRIDA)

Tris Base (PM: 121,1) ..... 121,1g

Completar para 500 mL com água deionizada.

Acertar para pH 8,9;

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

#### TRIS HCl 0,617 M (GEL EMPILHADOR)

Tris Base (PM: 121,1) ..... 7,475g

Completar para 100 mL com água deionizada.

Acertar para pH 6,8;

Filtrar a solução e guardar em geladeira.



**ACRILAMIDA/BIS (30% T / 1,87% C)**

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08) ..... 73,6g

N,N metileno bisacrilamida para eletroforese Sigma ..... 1,4g

Completar para 250 mL com água deionizada;

Aquecer se necessário.

**EDTA 0,5 M**

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico (PM: 380,2) ..... 19,01g

Completar para 100 mL com água deionizada.

Acertar para pH 8,3.

**LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 10%**

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4) ..... 10,0g

Completar para 100 mL com água deionizada.

**COOMASSIE BLUE 0,2% (BRILLIANT BLUE R – 250)**

Metanol ..... 500 mL

Ácido acético ..... 100 mL

Águabi destilada ..... 400 mL

Coomassie blue (Brilliant blue R) ..... 2,0g

Deixar em repouso durante duas horas e filtrar.

**GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)**

Lauril sulfato de sódio 10% ..... 10,0 mL

EDTA 0,5 M ..... 4,0 mL

Tris fosfato 0,617 M, pH 6,8 ..... 5,0mL

Mercaptoetanol ..... 3,0 mL

Glicerol ..... 10,0 mL

Água deionizada ..... 18,0 mL

Azul de bromofenol (Bromphenol Blue) ..... 5,0 mg

Separar em frações de uso (450 ou 900 µL) – manter no freezer até o momento do uso.

**PERSULFATO DE AMÔNIA 10%**

Persulfato de amônia ..... 0,1g

Água deionizada ..... 1,0 mL

(Preparar no momento da confecção do gel).

**DESCORANTE**

Metanol ..... 250,0 mL

Ácido acético ..... 100,0 mL

Completar para 1.000 mL com água deionizada.

Para acelerar o processo de descoloração, os géis podem ser colocados em estufa a 40°C.

**TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10X)**

TrizmaBase ..... 63,2g

Glicina ..... 39,9g

SDS ..... 10,0g

Completar para 1.000 mL com água deionizada.

Obs: para o uso na corrida usar o tampão de corrida diluído.

**TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (tampão de uso na cuba)**

Medir 100 mL do **tampão de corrida concentrado (10X)** e completar o volume para 1.000 mL.

**PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO MARKER E DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS**

8 µL de marker

2 µL de gel mix

Congelar até o momento do fracionamento ou preparar na hora do uso.

**PBS – CÁLCIO FREE (TAMPÃO FOSFATO SALINA)**

NaCl ..... 2,0g

KCl ..... 0,0625g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 12g

H<sub>2</sub>O ..... 0,2875g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,05g