

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES COM SEMENTES
DE *Crotalaria spectabilis* (Leg. *Papilionoideae*)**

Carolina Bellodi

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES COM SEMENTES
DE *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae)**

Carolina Bellodi

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2010

B446i Bellodi, Carolina
Intoxicação experimental de cães com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae) / Carolina Bellodi. -- Jaboticabal, 2010
xvi, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Mário Roberto Hatayde
Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Maria Angélica Dias
Bibliografia

1. Cães. 2. Biópsia hepática. 3. *Crotalaria spectabilis*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.9:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAROLINA BELLODI – nascida em Ribeirão Preto, ao 12º dia do mês de abril no ano de 1980, filha de Aristides Bellodi Neto e Carmen Sylvia Cascaldi Bellodi. Concluiu o curso de Medicina Veterinária em Dezembro de 2004, no Centro Universitário Moura Lacerda (CUML), onde fez parte da comissão do mutirão solidário de castração. Trabalhou em clínica veterinária particular de março de 2005 à janeiro 2007. É especialista em Clínica Médica de Pequenos Animais pelo Instituto Qualittas de Ensino desde dezembro 2006 e Especialista em Patologia Clínica Veterinária pela Universidade Estadual Paulista FCAV/UNESP - Jaboticabal, desde dezembro 2009. Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado em Medicina Veterinária (Clínica Médica) pela mesma faculdade e aprovada para iniciar seu doutoramento em agosto de 2010.

É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata trazendo tudo que
poderia ter sido e não foi.

Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda, quem quase morreu
está vivo, quem quase amou não amou.

Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se
perdem por medo, nas idéias que nunca sairão do papel por essa maldita mania de
viver no outono.

Pergunto-me, às vezes, o que nos leva a escolher uma vida morna; ou melhor, não me
pergunto, contesto. A resposta eu sei de cor, está estampada na distância e frieza
dos sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença do "Bom dia", quase que
sussurrado.

Sobra covardia e falta coragem até pra ser feliz.

A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai. Talvez esses fossem bons
motivos para decidir entre a alegria e a dor, sentir o nada, mas não são.

Se a virtude estivesse mesmo no meio termo, o mar não teria ondas, os dias seriam
nublados e o arco-íris em tons de cinza. O nada não ilumina, não inspira, não aflige
nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Não é que fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao alcance, para
coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência.

Porém, preferir a derrota prévia, à dúvida da vitória, é desperdiçar a oportunidade
de merecer.

Para os erros há perdão; para fracassos, chance; para amores impossíveis, tempo.

De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma.

Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance.

Não deixe que a saudade sufoque que a rotina acomode que o medo impeça de
tentar. Desconfie do destino e acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que
esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já
morreu.

(Luiz Fernando Veríssimo)

A Deus, pela oportunidade da vida;

Aos meus queridos avós, Aldo Bellodi, Diva Biancardi Bellodi (*in memoriam*), Sylvio Cascaldi e Ermelinda Bernine Cascaldi que foram e são uma lição de vida em minha trajetória;

Em especial aos meus pais, Carmen Sylvia Cascaldi Bellodi e Aristides Bellodi Neto, sempre foram meus alicerces, o início de tudo, muito obrigada pela credibilidade, amor, carinho, compreensão e amizade;

Por fim, todas as "pessoas" que acreditaram em meu potencial;

Dedico com muito amor e carinho.

A minha família pela credibilidade, momentos de descontração e força nos momentos difíceis;

A amiga e psicóloga Claudia Resende pelos sábios ensinamentos ao qual me fizeram compreender melhor o processo da vida;

A Universidade Estadual Paulista FCAV-UNESP Campus de Jaboticabal, por me acolher e me oferecer espaço para a execução do nosso trabalho;

A todos os funcionários do hospital veterinário Governador Laudo Natel, pelo apoio, dedicação e amizade nas horas mais difíceis;

Aos colegas de pós-graduação Javier Mesa e Denise Gomes de Melo, que foram fundamentais para execução do nosso trabalho, obrigada pelo esforço e dedicação;

Ao meu "pai-orientador" Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde, pela orientação, por acreditar no meu trabalho, pela lição de vida, pelos ensinamentos e principalmente por descobrir uma pessoa tão especial e generosa, o meu sincero respeito e muito obrigada;

Aos meus novos e eternos amigos de pós-graduação, que tive oportunidade de conhecer, conviver e aprender, em especial: Andréa Calado, Eduardo Garrido, Daniel Cortes Beretta, Jorge Cardoso, Tiago Barbalho, Márcia Teixeira, Giovanni Vargas, Sandra Nogueira;

Ao meu companheiro de todas as horas, Anselmo Augusto de Paiva Custódio, pelo carinho, paciência, orientações, dedicação, amor e amizade que nos mantém unidos;

Aos funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV - UNESP a Claudia, Renata e Paulo, que hoje nos tornamos grandes amigos;

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pelos conhecimentos e grande auxílio na estatística;

A querida Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos pelo auxílio à leitura das lâminas histológicas e pela amizade;

A magnífica colaboração da Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa e da Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Dias, para as melhorias executadas no presente trabalho, além do carinho e amizade que tornarão eternas;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Agradeço fortemente.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2.1 Características e distribuição geográfica da <i>Crotalaria spectabilis</i>	2
2.2 Toxicodinâmica e Características dos princípios tóxicos da <i>C. spectabilis</i>	5
2.3. Considerações sobre biópsia hepática.....	11
2.4 Considerações sobre bioquímica sérica.....	12
2.4.1 Hepática	12
2.4.2 Renal	13
2.4.3 Proteínas Totais.....	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Animais e Instalações	17
4.2 Grupos Experimentais e Modelo de Indução da Intoxicação	17
4.3 Momentos de Avaliação	18
4.4 Avaliação do quadro hematológico	19
4.5 Avaliação do quadro bioquímico sérico.....	19
4.6 Avaliação histopatológica.....	20
4.7 Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Peso corporal médio dos animais	23
5.2 Exame dos animais.....	24
5.3 Avaliação hematológica	28
5.4 Avaliação do quadro bioquímico sérico.....	39
5.5 Avaliação histopatológica.....	44
6. DISCUSSÃO	52

7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios para peso corpóreo (Kg) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes porcentagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....23
- Tabela 2.** Sinais clínicos apresentados pelos cães experimentalmente intoxicados, pelas diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis* (G₁, G₂ e G₃), ao longo dos 28 dias de intoxicação (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈). UNESP, Jaboticabal, 2010.25
- Tabela 3.** Análise de Variância das médias dos valores hematológicos, tendo como fontes de variação as análises dos grupos, dos animais nos grupos, dos tempos, dos tempos pelos grupos, Coeficiente de Determinação (R²) e do Coeficiente de Variação (CV), de cães intoxicados com diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis*, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.29
- Tabela 4.** Valores médios da contagem de hemácias (x10⁶/μL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....30
- Tabela 5.** Valores médios para taxa de hemoglobina (g/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....31
- Tabela 6.** Valores médios de hematócrito (%) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....32
- Tabela 7.** Valores médios da contagem de leucócitos (x10³/μL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....33
- Tabela 8.** Valores médios para contagem de neutrófilos bastonetes (x10³/μL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.34

- Tabela 9.** Valores médios para contagem de neutrófilos segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.35
- Tabela 10.** Valores médios para contagem de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....35
- Tabela 11.** Valores médios para contagem de linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....36
- Tabela 12.** Valores médios para contagem de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....37
- Tabela 13.** Valores médios para contagem de plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....38
- Tabela 14.** Análise de Variância dos valores médios das atividades séricas dos exames bioquímicos, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), creatinina, uréia e proteínas totais (PT), tendo como fontes de variação as análises: dos grupos, dos animais nos grupos, dos tempos, dos tempos pelos grupos, Coeficiente de Determinação (R^2) e do Coeficiente de Variação (CV), de cães intoxicados com diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis* por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.39
- Tabela 15.** Valores médios da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (U/L) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.....40
- Tabela 16.** Valores médios da atividade sérica de proteínas totais (g/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.41

- Tabela 17.** Valores médios da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (U/L) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.42
- Tabela 18.** Valores médios da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (U/L) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.42
- Tabela 19.** Valores médios da atividade sérica do metabólito creatinina (mg/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.43
- Tabela 20.** Valores médios da atividade sérica do metabólito uréia (mg/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.44
- Tabela 21.** Descrição dos achados histológicos de biópsia hepática de cães, em diferentes intensidades de lesões, submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de *C. spectabilis* (G₁, G₂ e G₃), a intervalos pré experimental e experimental, (T₀, T₁₄ e T₂₈).UNESP, Jaboticabal, 2010.45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Crotalaria spectabilis*: (A) - detalhes da planta mostrando folhas, racemos terminais com inflorescências amarelas; (B) – sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fonte: www.bioseeds.com.br, acesso 10/03/2010).....3
- Figura 2.** Estrutura química do AP monocrotalina, em detalhe (seta) apresentando sua dupla ligação (C1=C2), e seu anel heterocíclico (Fonte: ROCHA et al. 2009).7
- Figura 3.** Posicionamento da agulha tipo TRU-CUT[®] no fígado (detalhe – seta), guiada por ultra-sonografia, no momento do disparo, para a obtenção do fragmento hepático (Fonte: arquivo pessoal).....20
- Figura 4.** (A) Biópsia com Agulha cortante tipo TRU-CUT[®]– posicionamento da agulha e do animal para colheita do fragmento. (B) Tamanho da amostra de tecido hepático (detalhe) retirado do animal (Fonte: arquivo pessoal).22
- Figura 5.** Variação das médias dos pesos corpóreos (Kg) dos cães intoxicados, experimentalmente, com diferentes porcentagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂ e G₃), aferidos semanalmente, do início do experimento ao final nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈). UNESP, Jaboticabal, 2010.24
- Figura 6.** Cão macho, SRD, aproximadamente cinco anos de idade, com alopecia periocular, no 13^o dia de intoxicação com sementes de *C. spectabilis*, pertencente ao G₂ (Fonte: Arquivo pessoal).26
- Figura 7.** Cadela SRD, aproximadamente quatro anos de idade, com alopecia periocular mais discreta, no 9^o dia de intoxicação com sementes de *C. spectabilis*, pertencendo ao G₃ (Fonte: arquivo pessoal).....26
- Figura 8.** Cadela SRD, aproximadamente seis anos de idade, no 11^o dia de intoxicação pelas sementes de *Crotalaria spectabilis*, apresentando alopecia difusa, pertencendo ao G₃ (Fonte: arquivo pessoal).....27
- Figura 9.** Cadela SRD, aproximadamente dois anos de idade, apresentando secreção ocular bilateral serosa, hiperkeratose nasal e secreção nasal mucosa, no 20^o dia de intoxicação pelas sementes de *Crotalaria spectabilis*, pertencendo ao G₃ (Fonte: arquivo pessoal).....28
- Figura 10.** Valores médios da contagem de hemácias (x10⁶/μL), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).30
- Figura 11.** Valores médios da taxa de hemoglobina (g/dL), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).32

- Figura 12.** Valores médios da taxa de hematócrito (%), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....33
- Figura 13.** Valores médios da contagem de leucócitos (x10³/μL), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....34
- Figura 14.** Valores médios para contagem de linfócitos (x10³μ/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....36
- Figura 15.** Valores médios para contagem de monócitos (x10³μ/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....37
- Figura 16.** Valores médios para contagem de plaquetas (x10³μ/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....38
- Figura 17.** Valores médios da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (U/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....40
- Figura 18.** Valores médios da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (U/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).....43
- Figura 19.** Fotomicrografia de fígado de cão, que será intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₀ de intoxicação), apresentando discretíssima tumefação dos hepatócitos devido a início de degeneração hidrópica, Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.47
- Figura 20.** Fotomicrografia de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis*, (T₁₄ de intoxicação) Tumefação difusa de hepatócitos com pobre evidenciação dos sinusóides. Discreto acúmulo de linfócitos e plasmócitos associados a macrófagos, contendo pigmento anfófilico em seu citoplasma presente na região peri-portal (detalhe). Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.47
- Figura 21.** Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria Spectabilis* (T₁₄ de intoxicação) (A) Núcleo do hepatócito apresentando pigmento avermelhado (detalhe – seta), agregado de linfócitos nos sinusóides (B) (T₂₈ de intoxicação) células de Kupffer apresentando um pigmento esverdeado (seta) e o padrão dos hepatócitos é de degeneração grau moderado bem tumefeitos. Hematoxilina e Eosina .Obj. 40x.48

- Figura 22.** Fotomicrografia do fígado de cão na intoxicação com sementes *Crotalaria spectabilis* (T₁₄ de intoxicação) (A) Hepatócitos tumefeitos devido à degeneração hidrópica, em região peri-portal, anisocariose (setas – diferentes tamanhos de núcleos). (B) Vacuolização de células presentes nos sinusóides sugestivo de células Ito. Hematoxilina e Eosina .Obj. 40x.49
- Figura 23.** Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₁₄ de intoxicação). Presença de células Ito bem sutis, células de Kupffer apresentando pigmento acastanhado, agregado de linfócitos nos sinusóides (detalhe), vaso sanguíneo apresentando aumento de matriz extracelular (detalhe- seta) e discreta proliferação ductal. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.50
- Figura 24.** Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₂₈ de intoxicação). Área de fibrose e hemorragia ao redor de vaso sanguíneo. Tricrômio de Masson. Obj. 20x.50
- Figura 25.** Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₂₈ de intoxicação). Degeneração hidrópica moderada, presença de pigmento biliar no hepatócito, sugestivo colestase hepática (detalhe – seta), presença de nucléolos nos núcleos dos hepatócitos. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.51

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES COM SEMENTES DE *Crotalaria spectabilis* (Leg.Papilionoideae).

RESUMO – Sabe-se que a *C. spectabilis* é muito utilizada como adubação verde e para controle de nematóides, com isso espalha-se facilmente, misturando-se com o milho e outros cereais contaminando as rações. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar os efeitos tóxicos da semente de *Crotalaria spectabilis*, quando trituradas e misturadas à ração de cães. Nesse experimento foram utilizados 12 cães, 6 machos e 6 fêmeas, com idades variadas, divididos em três grupos de 4 animais. Os tratamentos foram divididos por grupos, sendo que cada grupo recebeu respectivamente, 0,2, 0,4 e 0,6% de sementes de *C. spectabilis*, por 28 dias, que foram trituradas e adicionadas à ração. Semanalmente avaliou-se o perfil hematológico e bioquímico dos cães, além do exame físico realizado diariamente. Nos exames bioquímicos realizados, houve alteração significativa da enzima GGT. Os sinais clínicos observados foram, principalmente, alopecia periocular e alopecia difusa, além de hiperkeratose nasal, espirros, tosse, vômitos esporádicos, constipação e fezes ressequidas. Para o exame histopatológico foi extraído um fragmento de fígado através de agulha tipo TRU-CUT®. Observou-se hepatócitos tumefados, vacuolização de células nos sinusóides, necrose focal, anisocitose, cariomegalia, células de Kupffer com variadas pigmentações, fibrose e presença de pigmento biliar nos hepatócitos caracterizando doença hepática. Concluiu-se baseado nos exames histopatológicos que as concentrações oferecidas de sementes de *C. spectabilis* 0,2, 0,4 e 0,6% no período de 28 dias são tóxicas aos cães.

Palavras-chave: alcalóides pirrolizidínicos, biópsia, cães, *Crotalaria spectabilis*, intoxicação, TRU-CUT®

**EXPERIMENTAL POISONING OF DOGS WITH *Crotalaria spectabilis* SEEDS
(*Leg.Papilionoideae*).**

ABSTRACT - It is known that *C. spectabilis* is widely used as green manure and for controlling nematodes, with that spreads easily, mingling with the infecting maize and other cereal rations. The aim of this study was to evaluate the toxic effects of *Crotalaria spectabilis* seeds, when crushed and mixed with the food of dogs. In this experiment we used 12 dogs, six males and six females, of various ages, which were divided into three groups of four animals. Each group received respectively 0.2, 0.4 and 0.6% of seeds of *C. spectabilis*, for 28 days, which were crushed and added to the diet. Weekly it was evaluated the hematological and biochemical profile of dogs, in addition to physical examination performed daily. In biochemical tests performed, significant alteration of the enzyme GGT. Clinical signs observed were mainly periocular alopecia and diffuse alopecia, and hyperkeratosis on nose, sneezing, coughing, occasional vomiting, constipation and dry feces. For the histopathology was extracted through a liver biopsy needle type TRU-CUT[®], it was observed tumefactive hepatocytes, vacuolization of cells in the sinusoids, focal necrosis, anisocytosis cariomegalia, Kupffer cells with different pigmentation, fibrosis and presence of bile pigment in hepatocytes, characterizing liver disease. It was based on histopathological examinations offered that concentrations of seeds of *C. spectabilis* 0.2, 0.4 and 0.6% during the 28 days are toxic to dogs.

Keywords: alkaloids pirrolizidines, biopsy, *Crotalaria spectabilis*, dogs, poisoning, TRU-CUT[®]

1. INTRODUÇÃO

Quando se pensa em toxicologia ou particularmente em intoxicação por plantas tóxicas, não poderíamos deixar de pensar também nos animais de companhia. Muito se tem estudado na área de grandes animais, pelo maior contato desses a essas plantas, mas na clínica médica de pequenos animais, eles também correm o risco de sofrer o mesmo tipo de contaminação. Com a multiplicidade de produtos lançados no mercado “pet”, que cresce exponencialmente, principalmente a comercialização de rações, nunca se obteve tanta variedade, cor, cheiro, tamanhos, palatabilidade, formatos, quanto atualmente. O controle de qualidade deve ser a maior preocupação das indústrias de rações, sem isso, aumenta muito o risco de contaminação por impurezas, onde essas são encontradas na própria matéria prima, exemplo dos cereais milho e soja. A dimensão desse problema é extensa e envolve uma série de fatores, começando com o tratamento do solo onde serão plantados e colhidos esses cereais que, por sua vez, são a base do alimento fabricado.

Pertencente à família *Leguminosaea*, a *Crotalaria spectabilis* é utilizada como adubação verde, sendo uma excelente fonte de nitrogênio para solos empobrecidos e dentre outras tantas funções também controladora de nematóides e plantas invasoras. Uma vez incorporada à terra, cresce junto às plantações de milho e outros cereais e suas sementes acabam por misturar-se durante o processo de colheita. Entretanto, por se tratar de uma semente extremamente pequena, 4 x 3 x 2mm, passa despercebida no meio do milho ou da soja que são vendidos às empresas produtoras de alimentos para animais. Já na fábrica, as sementes de *C. spectabilis* passam pelas peneiras, que deveriam reter as impurezas, contaminando a ração. Com isso, pode causar uma série danos aos animais de companhia e de produção.

Na maioria das vezes, o diagnóstico de intoxicação por plantas tóxicas não é feito, sendo seu tratamento sintomático ou confundido com outras patologias, impedindo assim que se explorem mais o assunto e novos estudos sejam feitos nessa área.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características e distribuição geográfica da *Crotalaria spectabilis*.

É um dos maiores gêneros de leguminosas, mais de 600 espécies distribuídas pelo mundo. Plantas do gênero *Crotalaria* são conhecidas como “xique-xique”, “guizo ou chocalho de cascavel”, pois seus frutos, quando secos, reproduzem som parecido ao serem tocados pelo vento. Recebeu esse nome *Crotalaria*, pois o termo em latim significa chocalho. Pertencem à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, (WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987). Seus principais usos são em solos pobres como adubação verde, destinadas à recuperação pelo seu alto poder de fixação de nitrogênio (JOLY, 1977; LORENZI, 1991) e também para controle de nematóides, tanto sozinha no solo ou quando associada à plantação. Isso se dá pelo seu efeito antagônico aos nematóides, devido ao seu princípio ativo tóxico (GARRIDO et al. 2008). PERIN et al. (2004), evidenciaram em seu trabalho no Brasil, que as leguminosas quando utilizadas como plantas de cobertura e ou adubação verde, poderão proporcionar uma economia substancial de fertilizantes nitrogenados sintéticos, devido à formação de associações simbióticas da planta com as bactérias fixadoras de nitrogênio no solo, contribuindo para a sustentabilidade da produção agrícola, seja de pastagens ou de culturas comerciais, especialmente o milho. As leguminosas da espécie *Crotalaria spp*, foram as que mais obtiveram destaque. HEINRICHS et al. (2005), citaram a *Crotalaria spectabilis* como uma das melhores fontes de adubação verde, utilizadas em seu trabalho com cultivo consorciado de milho. Ela pode ser útil para aumentar a reciclagem de nutrientes, principalmente o nitrogênio, e melhorar a produtividade em solos fracos. SCHAFFRATH (1999), afirmou que o consórcio com crotalarias diminuiu a ocorrência do crescimento de plantas espontâneas e também de nematóides, refletindo uma tendência do sistema se manter em equilíbrio, sem que uma espécie domine totalmente a outra.

A *Crotalaria spectabilis* é uma planta anual, ereta, ramificada, glabra, podendo chegar de 70 a 100 cm de altura, com reprodução por sementes. Sua folhas são simples, glabras na face superior, medindo de 6 a 12 cm de comprimento e de 2 a 4 cm de largura. Apresenta flores amarelas, muito vistosas, 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, tornando-se escuras e firmes quando maduras, medem 4 x 3 x 2mm e pesam 13,8 µg, em média (Figuras 1A e B) (LORENZI, 1991).

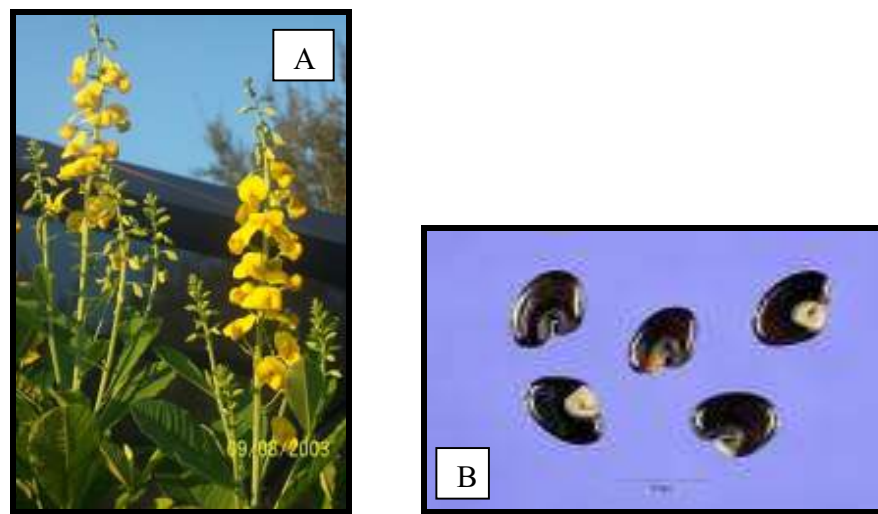


Figura 1. *Crotalaria spectabilis*: (A) - detalhes da planta mostrando folhas, racemos terminais com inflorescências amarelas; (B) – sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fonte: www.bioseeds.com.br, acesso 10/03/2010).

No Brasil, já foram registradas mais de 40 espécies de *crotalaria*, trazendo com isso perdas econômicas ocasionadas pela intoxicação acidental com animais (TOKARNIA et al. 2000). A *C. spectabilis* é tida como a crotalaria mais tóxica. Casos naturais de intoxicação têm sido descritos em eqüinos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves (CLARKE & CLARKE, 1967). Nos Estados Unidos, a *C. spectabilis* e a *C. giant striata* variedade da *C. mucronata*, crescem vastamente na planície costeira da Carolina do Norte, como plantas nativas (SMITH & OSBORNE, 1962). Assim um estudo feito no Norte da Austrália, mostrou que animais mantidos à pasto estavam morrendo. Foi identificada a presença de diferentes tipos de *crotalarias*, crescendo sem nenhum

controle, levando a uma perda econômica grande. Nesse estudo evidenciou-se que 36, das 40 subespécies já estudadas de *crotalaria*, são nativas ou naturalizadas na Austrália (FLETCHER et al. 2009). A grande quantidade de húmus e nitrogênio, adicionada ao solo pela *crotalaria*, aumenta muito a produção de milho e soja. Crescendo espontaneamente nas plantações, suas sementes são colhidas juntamente com o milho e soja, realizadas por colheita mecanizada, direcionando-se para algumas fábricas de rações, com pouco ou nenhum controle de qualidade. Sendo assim, quando esses produtos contaminados são ingeridos, produzem efeitos deletérios nos animais (SMITH & OSBORNE, 1962). O controle é excessivamente difícil, pois as sementes podem permanecer no solo por quatro anos ou mais, antes de germinarem; além disso, a *crotalaria* rebrota facilmente (EMMEL, 1943).

Segundo a portaria n° 845 de 8 de novembro de 1976, disponível em “home Page” 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 em uma peneira de crivos circulares a cinco milímetros (5mm) de diâmetro. Com isso as sementes que passarem pela peneira, cujas dimensões são de quatro, por três, por dois milímetros (4x3x2mm), irão contaminar à ração dos animais.

A espécie animal é o principal fator a ser considerado quando se analisa a diferença de resposta a um determinado toxicante. No caso de trabalho com carnívoros, as diferenças na anatomia e fisiologia podem promover variações substanciais de resposta à toxicidade. Tomando como exemplo a susceptibilidade aos alcalóides pirrolizidínicos que são os componentes tóxicos da *C. spectabilis*, sabe-se que bovinos, eqüinos, aves e suínos são muito sensíveis aos seus efeitos tóxicos, enquanto ovinos, caprinos e coelhos são bastante resistentes. Essa susceptibilidade à toxicidade está relacionada diretamente as diferenças de biotransformação e excreção desses alcalóides existentes entre as supracitadas espécies animais (SPINOZA et al. 2008).

2.2 Toxicodinâmica e Características dos princípios tóxicos da *C. spectabilis*.

Plantas do gênero *Crotalaria* contêm alcalóides pirrolizidínicos (APs), que estão presentes também em uma centena de espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias e distribuídas em diversas regiões geográficas do mundo. FU et al. (2002), estudando plantas, observou que 3% dessas plantas que florescem no mundo contêm APs considerados tóxicos e que eles são encontrados em mais de 20 grandes famílias de plantas. Apenas três famílias - *Boraginaceae*, todos os gêneros, incluindo *Echium* e *Heliotropum*; *Compositae (Asteraceae)* gêneros *Senecio* e *Eupatorium*, e *Leguminosae (Fabaceae)*, gênero *Crotalaria* - contêm os alcalóides considerados mais tóxicos (CHEEKE, 1998).

O AP encontrado em maior quantidade na *C. spectabilis*, é a monocrotalina, localizado em várias partes da planta, sendo a semente a parte mais tóxica (PIERCY & RUSOFF, 1946; WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987; SANTOS et al. 2008). BULL et al. (1968) e FLETCHER et al. (2009), estudando os possíveis APs encontrados nessas espécies de plantas tóxicas, depararam-se com a presença de outro tipo de alcalóide a espectabilina, encontrada em quantidades mínimas e não significativas ao comparar com a monocrotalina.

Alcalóides pirrolizidínicos são caracterizados por compostos que contêm nitrogênio no anel heterocíclico e geralmente são substâncias básicas. O núcleo dos APs contém de dois a cinco anéis e são responsáveis pela toxicidade de vários grupos de plantas (TAYLOR et al. 1997; FU et al. 2002; SANTOS et al. 2002; COPPLE et al. 2003; WANG et al. 2005; SANTOS et al. 2008). Esses anéis são constituídos por ésteres de dois aminoácidos, a retronecina (ácido necínico) e a heliotridina, ocorrendo em três grupos, mono ésteres não-cíclicos (abertos) e di-ésteres cíclicos, em ordem crescente de toxicidade. Os ácidos necínicos contêm de quatro a seis átomos de carbono, podendo ser ácidos mono ou di-carboxílicos sendo encontrados nos APs que exibem efeitos tóxicos. Para exercerem sua toxicidade, seja ela aguda ou crônica, os APs necessitam de uma ativação metabólica, essencial para exercerem sua genotoxicidade (YAN et al. 1995; SCHULTZE et al. 1996; TAYLOR et al. 1997; FU et

al. 2002; SANTOS et al. 2002; HANUMEGOWDA et al. 2003; COPPLE et al. 2004; LEE et al. 2005; WANG et al. 2005; SANTOS et al. 2008; FLETCHER et al. 2009). Essa ativação metabólica se apresenta por dupla ligação no carbono um e dois localizado no núcleo pirrolizidínico e uma ramificação no grupamento éster (SANTOS et al. 2002; SANTOS et al. 2008; FLETCHER et al. 2009).

BAILEY, (1978) relatou em seu estudo com diferentes mecanismos fisiológicos de plantas tóxicas que possuem APs em populações, que a maior parte dos alcalóides são absorvidos pelo trato gastrointestinal, através da corrente circulatória irão passar direto pelo fígado, mais tarde essas substâncias são redistribuídas pelo corpo, sendo excretadas pela urina. O fígado é o primeiro órgão alvo onde essas substâncias tóxicas vão sobrestar, desencadeando reações químicas ao qual irão dar início à toxicidade (biotransformação e detoxificação) Conseqüentemente, o sistema hepático pode vir a sofrer danos irreversíveis oriundos dessas substâncias químicas presentes nas plantas tóxicas, podendo ser manifestada nos animais pela depressão do sistema nervoso central, obrigando o órgão diminuir a produção de energia e diminuir a metabolização de outros nutrientes importantes ao corpo. Alguns sinais clínicos manifestados por animais intoxicados por APs são fibrose, estase biliar, megalocitose podendo levar à insuficiência hepática grave e a morte. O autor descreve também que a icterícia não é um achado clínico comum nos animais intoxicados pelos APs.

A monocrotalina, (Figura 2), é um alcalóide tipo retronecina, formado por uma base de necina (retronecina) com uma dupla ligação entre os carbonos um e dois, associadas a um ácido necínico (ácido monocrotálico), que além de efeito tóxico apresenta também atividade tumorigênica e toxicogênica, causando formação de pirróis dentro do DNA (FU et al. 2002).

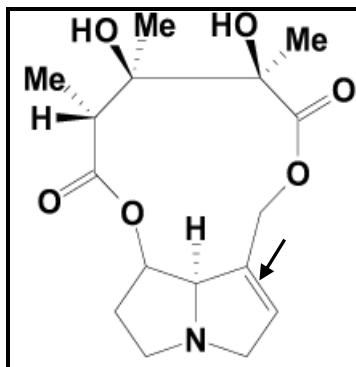


Figura 2. Estrutura química do AP monocrotalina, em detalhe (seta) apresentando sua dupla ligação (C1=C2), e seu anel heterocíclico (Fonte: ROCHA et al. 2009).

As principais rotas, no metabolismo hepático dos APs, a monocrotalina, são:

- Hidrólise pelo grupo funcional éster para formação da base retronecina e ácido monocrotálico;
- N-oxidação da base retronecina, formando a monocrotalina N-óxido e
- Desidrogenação formando derivados de dehidrocrotalina ou monocrotalina pirrol (os pirróis tóxicos) (BAILEY, 1978; FU et al. 2002; WANG et al. 2005; SANTOS et al. 2008).

As duas primeiras reações representam mecanismos de desintoxicação, enquanto que, a desidrogenação forma os pirróis e está associada com a toxicidade dos alcalóides. Os pirróis causam danos irreversíveis ao fígado, e lesam as células hepáticas por inibição da mitose (efeito alquilante), essa agressão ao fígado pode afetar células hepáticas parenquimatosas (hepatócitos), células não-parenquimatosas (células de Kupffer, células Ito, células endoteliais, células de ductos biliares e linfócitos associados ao fígado) e a matriz extracelular hepática (MEC), sendo essas lesões de padrão reversível ou irreversível, dependendo do grau da lesão causada no parênquima dessas células (TORRES & COELHO, 2008). A desidrogenação da monocrotalina é marcada pela formação do pirrol de monocrotalina (MCTP), sendo solúvel em água e já na circulação sanguínea tornando-se mais estável e sendo excretada pela urina (MATTOCKS, 1968; FU et al. 2002).

O equilíbrio dessas reações é que determina o efeito tóxico dos APs (MATTOCKS, 1968; 1986). A metabolização dos APs para formação dos compostos pirrólicos são, na maioria das vezes, catalisadas pelo sistema enzimático citocromo P450, no fígado, seguido pelos pulmões (MATTOCKS, 1986; CHEEKE, 1998). Esses compostos são eletrofilicos e reagem com componentes teciduais nucleofílicos, como ácidos nucléicos e proteínas (SPERL et al. 1995). Parte dos pirróis produzidos no fígado são agora metabólitos reativos e suficientemente estáveis que irão para a circulação através dos vasos portais, ligando-se aos tecidos, causando também injúria a outros órgãos como rins (nefrose) e pulmões (pneumonia intersticial). KIM et al. (1993), constataram que os pulmões também produzem pirróis por conter enzimas do sistema citocromo P450, que por sua vez é onde ocorre a metabolização. Os pirróis lesam as células hepáticas por inibição da mitose, causando megalocitose, necrose e redução do número de hepatócitos substituídos por tecido fibroso. Com isso levando ao aparecimento do quadro clínico e morte decorrente de disfunção hepática (SEAWRIGHT et al. 1991).

Para TAYLOR et al. (1997), os metabólitos da MCT são acumulados e possivelmente estabilizados pelos eritrócitos, ligando-se pela porção média do grupo tiol, na hemoglobina durante o transporte pela vasculatura pulmonar, onde irão promover uma doença pulmonar por um mecanismo pouco caracterizado, ou também é sabido da produção de pirróis em pequena quantidade por esse órgão, por conterem enzimas do sistema citocromo P450. Estes tioésteres pirrólicos formados são relativamente estáveis e persistem por longos períodos na hemoglobina. Quando a hemoglobina, contendo este tioéster, é homogeneizada em nitrato de prata etanólico, sob condições ácidas, há formação de um dietoxi-éter que é rapidamente liberado, podendo ser identificado por cromatografia de camada delgada, cromatografia a gás ou cromatografia líquida de alta pressão (BURROWS, 1991). Outros danos também encontrados foram: edema e necrose centro lobular, megalocitose, cariomegalia, fibrose, proliferação de ductos biliares, veno-oclusão e perda da função hepática (CHEEKE & SHULL, 1985; SCHULTZE et al. 1996; HANUMEGOWDA et al. 2003; WANG et al. 2005). Trabalhos demonstraram que a exposição a essas substâncias por

um longo período causa megalocitose de hepatócitos, veno-oclusão no fígado e nos pulmões, degeneração gordurosa, aumento do tamanho dos núcleos com cromatina condensada, 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 gastrointestinal, medula óssea e cérebro em humanos.

A monocrotalina no fígado produz necrose das células parenquimais centrolobulares, danos às células endoteliais das vênulas centrais e dos sinusóides, congestão e dilatação dos sinusóides e hemorragia. Uma consequência dos danos às células endoteliais vasculares é a ativação do sistema de coagulação. Durante a injúria vascular, as propriedades anticoagulantes e pró-fibrinolíticas das células endoteliais são perdidas, e a cascata de coagulação é iniciada através de fatores teciduais (COPPLE et al. 2003). Nesse contexto, a determinação da função hepática torna-se importante e, deve ser realizada através da dosagem sérica das enzimas AST, ALT, GGT e ALP, que indicam a presença de lesões hepáticas agudas ou crônicas, sendo que os aumentos nos níveis de GGT indicam lesões muito antigas nos ductos biliares (UNDERWOOD & SUTTLE, 2001).

Diferenças entre espécies animais no que se referem à susceptibilidade a intoxicação pelos APs são relatadas na literatura (HOOPER, 1978). A diferença entre algumas espécies mais susceptíveis são o resultado do balanço entre as relações de bioativação, desintoxicação e excreção dos alcalóides. Além desses fatores a qualidade da dieta do animal influencia no processo de detoxificação dos APs. Trabalhos experimentais com ratos demonstraram que altas concentrações de proteínas na dieta, reduzem a toxicidade dos alcalóides em virtude que aminoácidos que constituem a glutathiona, exercem importante papel na rota de detoxificação dos APs (CHEEKE, 2009).

Bovinos e equinos são muito susceptíveis a intoxicação por APs, sendo essas espécies mais susceptíveis a intoxicação de 30 a 40 vezes maior que ovinos e caprinos. A diferença parece estar relacionada com a capacidade do ovino a detoxificar os APs no fígado, relacionada à dieta consumida antes da domesticação, menos seletivos, desenvolviam resistência as toxinas. Atribuí-se também a resistência dos ovinos a uma maior quantidade de microorganismos no rúmen, capazes de biotransformar esses princípios tóxicos com maior eficiência que os bovinos (CHEEKE, 1994; RADOSTITS et al. 2002).

As diferentes respostas ou a resistência individual dos animais aos APs podem refletir em detoxificação bacteriana no trato gastrointestinal, taxa de conversão, no fígado, do AP a pirróis tóxicos, capacidade anti-oxidativa individual do animal, além da quantidade de AP ingerida na dieta. Trabalhos relataram ainda que possa haver susceptibilidade diferente nas diferentes raças, principalmente nos ovinos (CHEEKE, 1994; SANTOS et al. 2008).

Já foram apresentados relatos de intoxicação espontânea e experimental em várias espécies animais, entre elas: suínos (SOUZA et al. 1997; TORRES et al. 1997; HATAYDE et al. 1998; SOUZA et al. 1998), bovinos (REINDEL et al., 1991; SEAWRIGHT et al. 1991; BOGHOSSIAN, et al. 2007; TORRES & COUTO, 2008; FLETCHER et al. 2009), ratos (KAY et al. 1966; KAY et al. 1967; MEYRICK, 1978; CARTENS & ALLEN, 1970; CHEEKE, 1988; REINDEL et al. 1991; YAN, et al 1995; MEDEIROS et al. 1999; COPPLE et al. 2002; FU et al. 2002; COPPLE et al. 2003; WANG et al. 2005), humanos (SPERL et al. 1995; COPPLE et al. 2002; SANTOS et al. 2002; FU et al. 2002; COPPLE et al. 2003; WANG et al. 2005), ovinos (CHEEKE, 1988) equinos (CHEEKE, 1988; MELO, 2010-dados não publicados), coelhos (CHEEKE, 1988), perus (ALLEN, 1963; BURGUERA et al. 1983; ALFONSO et al. 1993), frangos (SIMPSON, et al.1963; FIGUEREDO et al. 1987; ALFONSO et al. 1993; HATAYDE et al. 1997a; HATAYDE et al. 1997b) e caprinos (MEDEIROS et al. 1999), mas não há relatos em pequenos animais.

SANTOS et al. (2002), evidenciaram em seu trabalho os efeitos benéficos da monocrotalina extraída das sementes da *C. spectabilis*. Quimicamente modificadas em

sua estrutura para monocrotalina pura e extração do N-óxido descobriram uma fonte de substâncias com ação anti-tumorigênica. Como resultado observaram que a monocrotalina pura e seu N-óxido atuaram fracamente sobre as células da leucemia HL-60, onde inibiu o crescimento celular em 20%, a resposta ao melanoma MV-3 foi inibida de forma mais ativa, chegando a 63% da inibição do crescimento celular. Concluíram portanto, que os APs, principalmente os em questão, podem ser deletérios ao organismo e por outro, lado quando bem explorados, uma boa fonte de substâncias com atividades anti-tumorigênicas. O estudo foi realizado e testado somente em ratos, observado também pelos autores a importância de novos estudos. NEVES (2010) descreveu que a *C. spectabilis* e a *C. juncea*, tem sido recomendadas para tratamento de várias doenças de pele em humanos, como psoríase, sarna e impetigo, podendo também influenciar diretamente, seu princípio ativo, no crescimento celular, mas ainda não há nenhum trabalho que comprove a sua eficácia cientificamente.

2.3. Considerações sobre biópsia hepática

A biópsia hepática percutânea com agulha cortante tipo TRU-CUT® pode ser uma fonte valiosa de informações quanto aos diversos parâmetros relacionados a função hepática em animais, bem como uma forma auxiliar de diversas lesões que acometem o fígado (MEDEIROS et al. 2002). Além disso, a biópsia hepática permite diagnosticar as lesões antes que os sinais clínicos tornem-se aparentes, diminuindo as perdas econômicas ou mortalidade dos animais afetados (DRIEMEIER, 1990). Segundo NELSON & COUTO (2001), a biópsia hepática é necessária para estabelecer o diagnóstico final e o prognóstico. Suas indicações são: explicar resultados anormais dos exames de estado e/ou função hepática, especialmente se persistirem por mais de um mês; explicar hepatomegalia de causa desconhecida; determinar o estágio de doença neoplásica; avaliar objetivamente a resposta a terapia; avaliar o progresso da doença previamente diagnosticada e não especificamente tratável (MEDEIROS et al. 2002).

2.4 Considerações sobre bioquímica sérica

2.4.1 Hepática

As funções do fígado em vários processos corporais incluem participação no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, na desintoxicação e excreção de catabólitos e de outras substâncias tóxicas na digestão (especialmente de gordura) e na síntese protéica, inclusive na de vários fatores de coagulação (TRALL, 2007).

Os testes utilizados para verificar a funcionalidade hepática objetivam avaliar: a integridade dos hepatócitos (atividade enzimática de alanina aminotransferase ALT, com maior uso em animais de companhia e aspartato aminotransferase AST, esse com maior utilização em grandes animais) e do sistema biliar (atividade de fosfatase alcalina ALP e gama glutamiltransferase GGT); Função excretora do fígado avaliada pelas bilirrubinas e ainda a síntese de componentes do sangue (uréia, albumina, fibrinogênio, protrombina, dentre outros). Tais procedimentos permitem detectar hepatopatias ocultas, determinar a gravidade da hepatopatia, monitorar a progressão da doença e estabelecer o prognóstico (TENNANT, 1997). As aminotranferases ALT e AST correspondem ao principal grupo de enzimas que sinalizam lesão dos hepatócitos. Essas enzimas de extravasamento, ALT e AST, têm suas atividades séricas determinadas, em parte, pela localização intracelular; a ALT está presente em maior quantidade no citoplasma e a AST está localizada no citoplasma e na mitocôndria. Deste modo, o extravasamento de AST é mais difícil em razão de sua localização mitocondrial, pois há necessidade de atravessar duas barreiras físicas (membrana mitocondrial e citoplasmática). As atividades séricas de ambas as enzimas se elevam quando há hipóxia tecidual e disfunção hepatocelular (TENNANT, 1997; TRALL, 2007). Contudo, há pouca relação entre a alteração quantitativa na atividade enzimática e a extensão ou reversibilidade da lesão hepática (MEYER, 1993). As atividades séricas das enzimas são influenciadas pela sua localização e concentração intracelular, pelo volume tecidual total do órgão responsável pela sua produção, pelo grau de lesão

celular, pela taxa de necrose e apoptose e meia vida da enzima no plasma (KRAMER & HOFFMANN, 1997).

O fígado sintetiza a maior parte das proteínas plasmáticas, inclusive a albumina, e a totalidade das frações de alfa globulinas e beta globulinas. As funções das proteínas compreendem fornecimento de aminoácidos para os tecidos, manutenção de pressão osmótica coloidal, tamponamento para manutenção do equilíbrio ácido-básico, transporte de várias moléculas e íons, homeostasia, controle da resposta inflamatória, e participação dos mecanismos de resistência à infecção; a albumina é a mais abundante das proteínas plasmáticas, compreendendo 35 a 50% do teor sanguíneo de proteína total em mamíferos (THOMAS, 2000).

2.4.2 Renal

O rim exerce papel fundamental na manutenção da homeostase por meio da excreção de resíduos metabólicos e da absorção de substâncias filtradas necessárias ao organismo; além disso, sintetiza hormônios que participam no controle da pressão sanguínea sistêmica e da hematopoese. Quando há comprometimento da função renal as substâncias normalmente excretadas pelos rins se acumulam no organismo. No entanto, essas alterações somente são detectadas em exames de laboratório quando a taxa de filtração glomerular se reduz a menos de um terço dos valores fisiológicos. O termo azotemia refere-se ao acúmulo de metabólitos nitrogenados no sangue, sendo a determinação das concentrações sanguíneas de uréia e creatinina indicadores de azotemia (FINCO, 1997).

As proteínas representam a principal fonte de amônia necessária à síntese de uréia, de modo que a síntese de uréia depende do metabolismo protéico. Qualquer distúrbio que induza aumento do metabolismo protéico pode resultar em elevação na concentração sanguínea de uréia ou ácido úrico. A maior parte de uréia plasmática é excretada pelos glomérulos e sua dosagem sérica é considerada importante teste indicador de disfunção na filtração glomerular e reabsorção tubular (MEYER et al, 1995). Situações que provocam uma diminuição na velocidade de filtração glomerular

levam a um aumento na reabsorção de uréia nos túbulos coletores, aumentando sua concentração plasmática (KANEKO, 1997).

2.4.3 Proteínas Totais

As proteínas são constituintes essenciais para todas as células do organismo, correspondendo cerca de 18% do peso corporal dos animais, e em sua maior parte, sintetizadas pelo fígado. Constitui um grupo de moléculas heterogêneas que atuam na formação das estruturas das células, na manutenção da pressão colóido-osmótica, na catalização de reações bioquímicas (enzimas), regulação (hormônios), coagulação e defesa humoral (anticorpos). Idade e nutrição são fatores de grande importância, que influenciam, diretamente, a quantidade de proteínas plasmáticas totais (KANEKO, 1997).

A avaliação laboratorial dos teores de proteínas do plasma e do soro sanguíneo tipicamente é parte integrante dos exames hematológicos e bioquímicos em animais. Alterações na concentração plasmática ou sérica de proteínas são as principais anormalidades laboratoriais em algumas doenças: geralmente nota-se alteração no teor de proteínas em varias enfermidades. A medição do teor sérico de proteínas costuma fornecer informações importantes, que podem ser úteis para limitar a lista de doenças que devem ser investigadas, e em alguns casos indicar alguma doença específica (TRALL, 2007).

Os dois principais tipos de proteínas do plasma são albumina e globulinas. A albumina é a proteína mais abundante do soro, constitui entre 35-50% das proteínas séricas totais. Seu papel mais importante é sua função metabólica de se ligar e transportar outras proteínas. Praticamente, todos os constituintes do plasma que não necessitam ser transportados por uma proteína específica utilizam, para esse fim, a albumina (KANEKO, 1997).

A albumina é a menor delas e sua quantidade no sangue é maior que a de globulinas. Conseqüentemente a albumina responde por cerca de 80% da pressão oncótica do sangue, impede que a água passe do sangue para os tecidos. Ela também

é uma importante proteína transportadora, com significativa participação no transporte de ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, cálcio, hormônios e medicamentos. Ela é sintetizada no fígado, atinge a corrente sanguínea e sua metabolização se dá na maioria dos tecidos. As outras representantes são as globulinas, que aparecem em menor número, mas, de extrema importância, representam um grupo heterogêneo de proteínas grandes, mas de tamanhos variados. Abrangem diversos tipos de moléculas de anticorpos, outras proteínas que atuam nos sistema imune, fatores de coagulação, enzimas e proteínas transportadoras de lipídeos, vitaminas, hormônios, hemoglobina extracelular e íons metálicos (TRALL, 2007).

Assim, através deste trabalho pretende-se verificar os efeitos hematológicos, bioquímicos e histológicos da ingestão experimental de sementes de *C. spectabilis* quando trituradas e misturadas à ração de cães por um período determinado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da toxicidade da *Crotalaria spectabilis*, pela ingestão de sementes trituradas e adicionadas a ração, em cães.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar clinicamente os cães antes e durante o período experimental;
- Acompanhar o quadro hematológico de cães intoxicados experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis* em diferentes doses;
- Verificar o perfil bioquímico através da dosagem sérica das enzimas ALT, GGT e ALP e os metabólitos Uréia e Creatinina;
- Avaliar possíveis danos histológicos na intoxicação, por meio de biópsias hepáticas com agulha tipo TRU-CUT®.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA), da Universidade Estadual Paulista UNESP Campus Jaboticabal e foi aprovado pela Comissão de Ética e bem estar animal, em reunião de 14 de agosto de 2008, sob protocolo número 0016735-08.

4.1 Animais e Instalações

Foram utilizados 12 cães, 6 machos e 6 fêmeas, com idades variadas, sem raça definida, pesando entre 8 e 20 Kg, provenientes do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal, CPPAR localizado na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP Campus de Jaboticabal, alojados individualmente em canis, equipados com comedouros e bebedouros individuais, no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP - Jaboticabal.

Todos os animais receberam a mesma ração durante a realização do experimento; dieta composta de ração comercial (PURUCA[®] carne e vegetais, BASA - Brasília Alimentos S/A), conforme as recomendações do National Research Council – NRC (2006), 350g/animal/dia, uma vez ao dia e água *ad libitum*.

Todos os animais foram vermifugados (ENDOGARD[®] 10-20 kg - VIRBAC, São Paulo, SP) e exames físicos foram realizados antes do início do experimento, para normalização dos parâmetros fisiológicos.

4.2 Grupos Experimentais e Modelo de Indução da Intoxicação

Os 12 cães foram divididos em três grupos (G_1 , G_2 e G_3), com quatro animais por grupo ($n=4$), e receberam proporções com diferentes inclusões de sementes de *C. spectabilis* na ração; o primeiro grupo (G_1) recebeu 0,2%, o segundo (G_2) 0,4% e o terceiro (G_3) 0,6% de sementes, baseados em trabalhos já realizados em outras

espécies e em um projeto piloto, por um período de 28 dias (quatro semanas). Os grupos foram manejados da seguinte forma:

G₁ - Ração comercial + 0,2% de sementes de *C. spectabilis* (que correspondem 0,6 g de sementes), por 4 semanas;

G₂ - Ração comercial + 0,4% de sementes de *C. spectabilis* (que correspondem 1,2 g de sementes), por 4 semanas;

G₃ - Ração comercial + 0,6% de sementes de *C. spectabilis* (que correspondem 1,8 g de sementes), por quatro semanas.

As sementes foram trituradas, peneiradas, pesadas e embaladas individualmente em saquinhos plásticos, obedecendo à dose estipulada por grupo e a refeição do dia. No momento da alimentação, 350 gramas de ração eram misturados às sementes trituradas, para facilitar a aderência das mesmas aos peletes.

Diariamente os comedouros, bebedouros e canis foram inspecionados para observar a ingestão de alimento e água, bem como a presença de vômito, diarreia, consistência das fezes além de detectar o excesso de pêlo dentro dos canis. Realizaram-se também exames clínicos e físicos dos animais e, semanalmente a pesagem destes.

Foi estabelecido o tempo zero (T₀), como controle, correspondentes aos índices basais de cada animal antes do início do fornecimento de sementes de *C. spectabilis*, para a realização dos exames hematológicos, bioquímicos e histopatológicos.

4.3 Momentos de Avaliação

Para determinação dos parâmetros normais, as amostras biológicas (sangue e amostra de fígado) foram colhidas no período pré-experimental, sem a inclusão das sementes à ração, determinando o T₀. Para o período experimental, os momentos de colheita foram: tempos 7 (T₇), 14 (T₁₄), 21 (T₂₁) e 28 (T₂₈), onde as parcelas já estavam recebendo diariamente diferentes dosagens de sementes de *C. spectabilis*.

Os dados obtidos para colheita de sangue foram em intervalos de sete dias, semanalmente, contados a partir da inclusão da semente à ração fornecida aos

animais. Para as amostras de fígado (biópsia hepática) foram estabelecidos os momentos de colheita nos tempos T_{14} e T_{28} . As amostras foram manejadas como mostra o esquema abaixo:

4.4 Avaliação do quadro hematológico

Para a realização do hemograma, amostras de sangue foram colhidas por punção das veias jugular ou cefálica, em tubos devidamente identificados contendo em seu interior o anticoagulante EDTA a 10% (ácido etilenodiaminotetracético). Estes foram homogeneizadas e processadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – UNESP. As contagens de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e a taxa de hemoglobina e hematócrito foram obtidos utilizando um contador de células automático (POCH-100lv Diff, SYSMEX - Japão). As contagens diferenciais dos leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com solução de Rosenfeld (JAIN, 1986).

4.5 Avaliação do quadro bioquímico sérico

Para avaliação da bioquímica sérica, o sangue colhido foi acondicionado em tubos devidamente identificados, mas sem a presença do anticoagulante. Estes foram mantidos à temperatura ambiente até que houvesse a retração do coágulo, e então centrifugado para a separação das alíquotas de soro. A centrifugação ocorreu por um período de 10 minutos a 3000 G, sendo acondicionadas em EPPENDORFS[®], (EPPENDORF do Brasil, São Paulo, SP) e armazenadas a - 20°C para posterior realização dos exames bioquímicos.

Foram determinadas as enzimas Gama glutamiltransferase, (GGT, Metodologia Sazasz modificado), Fosfatase alcalina, (ALP, Metodologia Bowers e Mc Comb modificado), Alanina Aminotransferase, (ALT, Metodologia Cinética UV-IFCC), com a utilização de kits comerciais (LABTEST[®] - Lagoa Santa, MG), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. As leituras das reações foram realizadas pelo equipamento

de espectrofotometria semi-automático (LABQUEST® - Belo Horizonte, MG), com luz de comprimento de onda apropriado para cada um deles.

A avaliação renal inclui a dosagem de uréia (Metodologia enzimático UV) e creatinina sérica, (Método Labtest) com a utilização de kits comerciais (LABTEST® - Lagoa Santa, MG), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. A leitura foi realizada pelo equipamento de espectrofotometria semi-automático (LABQUEST® - Belo Horizonte, MG).

4.6 Avaliação histopatológica

As biópsias hepáticas foram realizadas em três momentos diferentes: T₀, T₁₄ e T₂₈ do experimento.

Foram colhidas amostras de fígado através da técnica de biópsia percutânea com agulha cortante tipo TRU-CUT® (US BIOPSY®- Franklin,USA), calibre 18 Gauges (G) (1,2mm x 25cm), guiado por ultra-sonografia (Figura 3), para acompanhamento das lesões ocasionadas pela intoxicação experimental, através de exames histopatológicos.



Figura 3. Posicionamento da agulha tipo TRU-CUT® no fígado (detalhe – seta), guiada por ultra-sonografia, no momento do disparo, para a obtenção do fragmento hepático (Fonte: arquivo pessoal).

Para a execução da técnica de biópsia hepática percutânea, os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas, e levados à sala de ultra-sonografia, onde foram contidos em decúbito lateral esquerdo. Uma área de 5 cm de largura por 10 cm de comprimento foi tricotomizada na altura do 12° e 13° espaços intercostais, delimitando o espaço onde foi feita a varredura para observação dos lobos hepáticos. Essa área depois de tricotomizada foi submetida à anti sepsia com álcool 70%. Localizado o lobo a ser puncionado, o animal foi anestesiado com uma dose de PROPOFOL[®], (Sandoz – Cambé, PR), na dose de 6mg/kg. Foi realizada então uma pequena perfuração na pele e musculatura abdominal com agulha 40x12, onde a agulha tipo TRU-CUT[®] foi introduzida acoplada a uma pistola automática, e ao transdutor, formando um ângulo de 90° com a imagem refletida (Figura 4A). Introduziu-se a agulha no local perfurado, acionando-se o gatilho, a agulha interna avançou para o alvo, dois centímetros, e retrocedeu rapidamente para dentro da agulha externa e assim um fragmento de tecido ficou retido na reentrância da agulha interna, como mostra Figura 4B. Retirou-se a agulha lentamente do alvo e por meio de exame ultrasonográfico verificou-se a área, para detectar possíveis focos hemorrágicos locais. Retirou-se então a amostra da agulha com cuidado, mergulhando-a em uma solução de formalina a 10%, para ser levado ao Departamento de Patologia Veterinária onde foi processado.

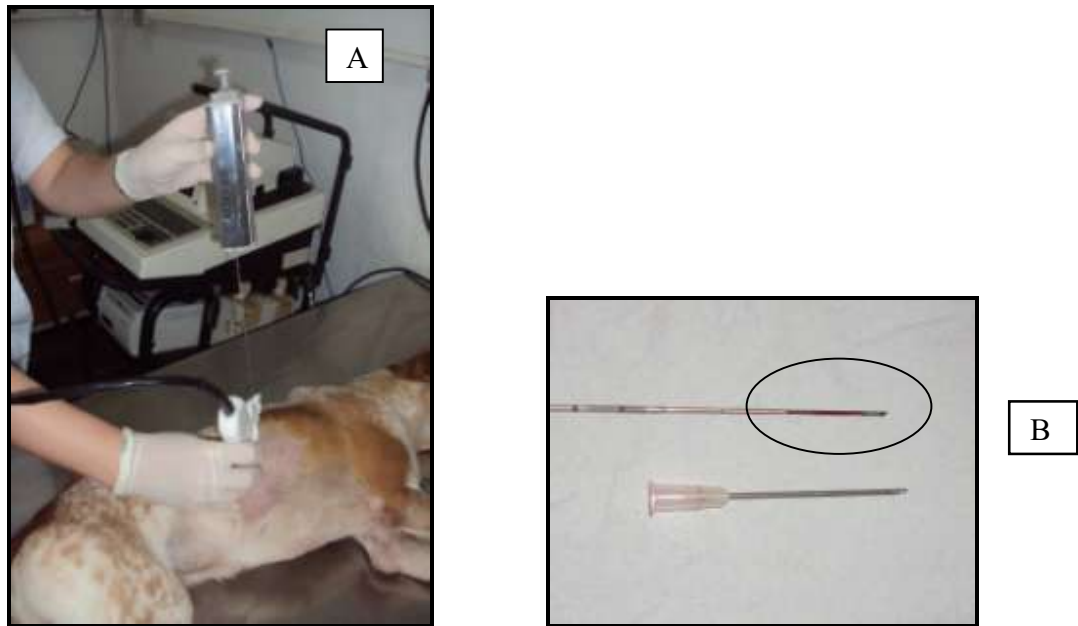


Figura 4. (A) Biópsia com Agulha cortante tipo TRU-CUT® – posicionamento da agulha e do animal para colheita do fragmento. (B) Tamanho da amostra de tecido hepático (detalhe) retirado do animal (Fonte: arquivo pessoal).

No Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, FCAV – UNESP, Jaboticabal, essas amostras permaneceram em formalina a 10% por 24 horas, para permitir a completa fixação do tecido. Após este período foi realizado processamento das amostras para a confecção e coloração das lâminas histológicas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM), segundo a técnica descrita por Luna (1968).

4.7 Análise estatística

Após a obtenção dos dados, estes foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas, com um fator de tratamento de três níveis entre animais (G_1 , G_2 e G_3) e um fator de tempo com cinco níveis (T_0 , T_7 , T_{14} , T_{21} e T_{28}), com quatro animais em cada grupo. A comparação das médias foi realizada o teste de Tukey, para fatores principais de interação, com um valor de interação de significância $p < 0,05$ ou 5% de probabilidade. Foram executadas no programa Statical Analysis System – SAS (1996).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram o grau de toxicidade das sementes de *C. spectabilis* em cães. Observou-se que os animais alimentados com diferentes percentuais das sementes, apresentaram sinais clínicos de diversas intensidades apresentando, portanto, variações de animal para animal nos diferentes grupos. Avaliaram-se esses animais de diversas formas, peso corporal (Kg), exames físicos, laboratoriais e histopatológicos.

5.1 Peso corporal médio dos animais

Notou-se que dos 12 cães presentes no experimento, não houve relevância na média do peso corporal desses animais, nas semanas do período experimental.

Tabela 1. Valores médios para peso corpóreo (Kg) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes porcentagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	PESO (Kg)					Erro Padrão Médio (EPM)
	Tempos		de			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈	
G ₁	19,40 ^{Aa}	19,10 ^{Aa}	19,40 ^{Aa}	19,20 ^{Aa}	18,90 ^{Aa}	\pm 0,48
G ₂	9,50 ^{Ba}	9,40 ^{Ba}	9,70 ^{Ba}	9,60 ^{Ba}	9,50 ^{Ba}	\pm 0,53
G ₃	8,20 ^{Ca}	7,80 ^{Ca}	8,20 ^{Ca}	8,20 ^{Ca}	8,40 ^{Ca}	\pm 0,53

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

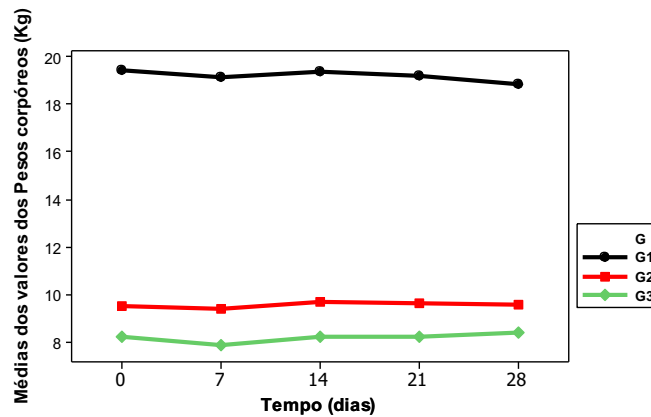


Figura 5. Variação das médias dos pesos corpóreos (Kg) dos cães intoxicados, experimentalmente, com diferentes porcentagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂ e G₃), aferidos semanalmente, do início do experimento ao final nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈). UNESP, Jaboticabal, 2010.

5.2 Exame dos animais

Ao decorrer das 4 semanas de intoxicação experimental, os animais apresentaram sinais clínicos inespecíficos, em diferentes graus e períodos, conforme descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sinais clínicos apresentados pelos cães experimentalmente intoxicados, pelas diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis* (G₁, G₂ e G₃), ao longo dos 28 dias de intoxicação (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈). UNESP, Jaboticabal, 2010.

Sinais Clínicos	Grupos Experimentais		
	G ₁	G ₂	G ₃
Alopecia periocular	+	++	++
Secreção ocular serosa	+	++	++
Secreção nasal bilateral mucosa	+	+	++
Alopecia difusa	-	+++	+++
Hiperkeratose nasal	+	-	++
Espirros	+	++	++
Tosse	+	++	++
Vômitos esporádicos	+	+	-
Tenesmo	+	+	+
Constipação	++	+	+++

- ausente; + leve; ++ moderado; +++ severo

Os sinais clínicos começaram a aparecer a partir do 10^o ao 13^o dia, na maioria dos grupos, ficando mais evidentes a partir da terceira semana em todos os grupos. Alguns sinais clínicos eram bastante evidentes, principalmente nos animais com maior pigmentação na pele. Os sinais mais freqüentes foram alopecia periocular nos animais e alopecia difusa. Essa alopecia se intensificou ao longo das semanas com o fornecimento em doses diárias das sementes tóxicas em todos os animais, sendo mais precoce e intenso no G₃. As Figuras 6, 7 e 8 ilustram os quadros de alopecia periocular e difusa, respectivamente, de cães nos diferentes tempos e grupos.



Figura 6. Cão macho, SRD, aproximadamente cinco anos de idade, com alopecia periorcular, no 13° dia de intoxicação com sementes de *C. spectabilis*, pertencente ao G₂ (Fonte: Arquivo pessoal).



Figura 7. Cadela SRD, aproximadamente quatro anos de idade, com alopecia periorcular mais discreta, no 9° dia de intoxicação com sementes de *C. spectabilis*, pertencendo ao G₃ (Fonte: arquivo pessoal).



Figura 8. Cadela SRD, aproximadamente seis anos de idade, no 11º dia de intoxicação pelas sementes de *Crotalaria spectabilis*, apresentando alopecia difusa, pertencendo ao G₃ (Fonte: arquivo pessoal).

Os espirros, vômitos e tosse apareceram nos três grupos logo na primeira semana de inclusão das sementes. Vômitos esporádicos ocorreram em todos os grupos durante ou após a alimentação.

Na segunda semana experimental, os cães já não apresentavam vômitos e se alimentaram até o fim do experimento. As secreções oculares serosas e nasais bilaterais mucosas apareceram nos três grupos e manifestaram-se na última semana do experimento, assim como o aparecimento de hiperqueratose nasal, evidenciado nos G₁ e G₂, no mesmo período (Figura 9).



Figura 9. Cadela SRD, aproximadamente dois anos de idade, apresentando secreção ocular bilateral serosa, hiperqueratose nasal e secreção nasal mucosa, no 20º dia de intoxicação pelas sementes de *Crotalaria spectabilis*, pertencendo ao G₃ (Fonte: arquivo pessoal).

5.3 Avaliação hematológica

O perfil hematológico dos animais intoxicados, não revelou nenhuma alteração. A Tabela 3, demonstra através da Análise de Variância o comportamento das médias dos valores hematológicos, sendo as possíveis as fontes de variação grupos (G), animais nos grupos A(G), tempo (T) e o tempo sobre o grupo T*G, valores significativos a 1% ($p < 0,01$) e a 5% ($p < 0,05$) de probabilidade respectivamente.

Tabela 3. Análise de Variância das médias dos valores hematológicos, tendo como fontes de variação as análises dos grupos, dos animais nos grupos, dos tempos, dos tempos pelos grupos, Coeficiente de Determinação (R^2) e do Coeficiente de Variação (CV), de cães intoxicados com diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis*, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Níveis Mínimos de Significância (p)									
		Hem	Leuc	Hb	Ht	Eos ^{''}	NB ^{''}	NS	Lin ^{f''}	Mon ^{''}	Plaq
Grupo (G)	2	0,08 ^{ns}	0,8 ^{ns}	0,02 [*]	0,02 [*]	0,14 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,01 [*]	0,03 [*]
A(G)	10	<.0001 ^{**}	<.0001 ^{**}	<.0001 ^{**}	<.0001 ^{**}	<.0001 ^{**}	0,3 ^{ns}	0,008 ^{**}	<.0001 ^{**}	0,83 ^{ns}	<.0001 ^{**}
Tempo (T)	4	0,004 ^{**}	0,001 ^{**}	0,01 [*]	0,0003 ^{**}	0,4 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,001 ^{**}	0,89 ^{ns}	0,0006 ^{**}
Tempo x Grupo (G*T)	8	0,007 ^{**}	0,33 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,01 [*]	0,12 ^{ns}	0,04 [*]	0,04 [*]	0,0003 ^{**}	0,04 [*]	0,2 ^{ns}
Erro (b)	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R²		0,86	0,8	0,9	0,9	0,7	0,5	0,6	0,8	0,45	0,9
CV		7,6%	21,63%	8,34%	8,2%	41,80%	121,2%	29,1%	25,4%	84,68%	17,29%

Médias seguidas pelos valores menores que 0,05 ($p < 0,05$) são valores significativos a 5% de probabilidade. (*)

Médias seguidas pelos valores maiores que 0,05 ($p > 0,05$) são valores não significativos a 5% de probabilidade. (ns)

Médias seguidas pelos valores menores que 0,01 ($p < 0,01$) são valores significativos a 1% de probabilidade. (**)

Valores transformados a logaritmos, Leos +1, Lnb +1, Linf +1 e Lmon +1. (")

Tabela 4. Valores médios da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (célx $10^6/\mu\text{L}$)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T_0	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}		
G_1	7,42 ^{Aab}	7,38 ^{Aab}	7,78 ^{Aab}	7,86 ^{Aa}	6,62 ^{Ab}	$\pm 0,23$	5,5 – 8,5
G_2	5,90 ^{Ba}	6,33 ^{Aa}	5,67 ^{Ba}	6,70 ^{Aa}	5,53 ^{Aa}	$\pm 0,26$	
G_3	6,53 ^{Aa}	7,58 ^{Aa}	6,52 ^{Aa}	6,94 ^{Aa}	7,25 ^{ABa}	$\pm 0,26$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ao nível de 5% de probabilidade. *Valor de referência para contagem global de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

A contagem de hemácias diferenciou-se nos tempos de colheita. Em todos os grupos, ao final dos 28 dias de intoxicação experimental, evidenciou-se uma tendência a queda nos valores médios de hemácias. A Figura 10 demonstra através do gráfico que no grupo G_1 , onde a ingestão de sementes de *C. spectabilis* foi à menor porcentagem, observou-se uma queda significativa no número de hemácias do T_{21} para o T_{28} .

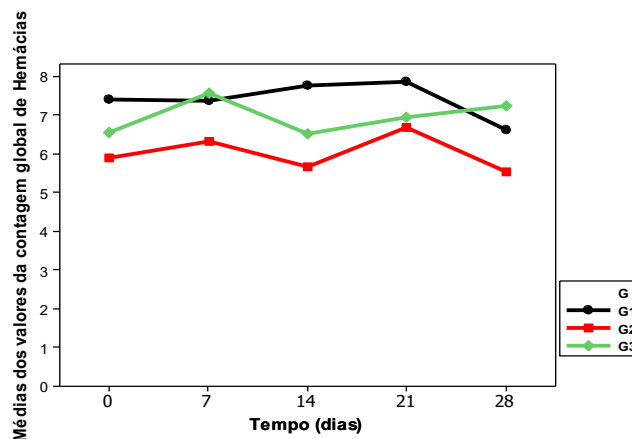


Figura 10. Valores médios da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T_0 , T_7 , T_{14} , T_{21} e T_{28}) e nos diferentes grupos (G_1 , G_2 e G_3).

A Tabela 5 ilustra os valores médios para taxa de hemoglobina e erro padrão médio, dos cães que foram submetidos a diferentes doses de sementes de *C. spectabilis* na ração, contudo notou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos tempos de colheita e grupos. No G_1 houve um aumento aos 14 e aos 21 dias de experimento, na taxa de hemoglobina. Já no G_2 esse aumento foi observado no 21º dia de experimento. A Figura 11 demonstra as alterações entre os grupos e os tempos de colheita

Tabela 5. Valores médios para taxa de hemoglobina (g/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (g/dL)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G₁	16,56 ^{Aa}	16,68 ^{Aa}	17,32 ^{Aa}	18,00 ^{Aa}	15,76 ^{Aa}	$\pm 0,56$	12 – 18
G₂	12,47 ^{Ba}	13,32 ^{Ba}	12,05 ^{Ba}	14,00 ^{Ba}	11,37 ^{Ba}	$\pm 0,63$	
G₃	14,35 ^{Aa}	14,40 ^{Aa}	14,25 ^{Ca}	15,15 ^{Aa}	15,42 ^{ABa}	$\pm 0,63$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para taxa de hemoglobina (g/dL) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO 1)

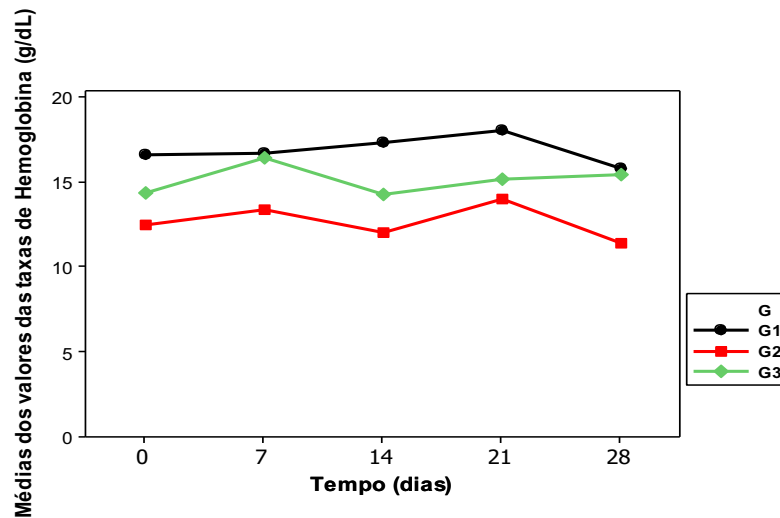


Figura 11. Valores médios da taxa de hemoglobina (g/dL), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).

Tabela 6. Valores médios de hematócrito (%) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (%)
	Tempos		colheita		amostras (T)		
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	44,44 ^{Ab}	50,48 ^{Aab}	53,42 ^{Aab}	53,74 ^{Aa}	45,14 ^{Ab}	$\pm 1,64$	37 – 55
G ₂	37,77 ^{Aa}	40,57 ^{Ba}	35,85 ^{Ba}	42,30 ^{Ba}	34,97 ^{Ba}	$\pm 1,84$	
G ₃	43,07 ^{Aa}	50,02 ^{ABa}	42,82 ^{Ca}	46,25 ^{Aa}	47,0 ^{ABa}	$\pm 1,84$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para taxa de hematócrito (%) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Nota-se na Tabela 6 que os grupos e os tempos se diferenciaram para a variável hematócrito. No G₁ houve diferença quanto aos tempos de colheita, principalmente no

T₂₁ com relação aos T₀ e T₂₈. O valor de T₂₁ aumentou em relação ao grupo, sendo ilustrado na Figura 12 os aumentos e as diminuições citadas na tabela acima.

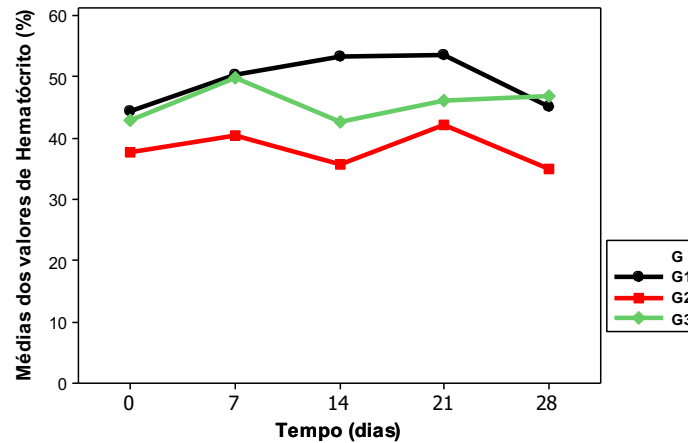


Figura 12. Valores médios da taxa de hematócrito (%), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).

Tabela 7. Valores médios da contagem de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (célx10 ³ μL)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	8,46 ^{Aa}	9,02 ^{Aa}	6,50 ^{Aa}	8,46 ^{Aa}	7,40 ^{Aa}	$\pm 0,83$	6 – 18
G ₂	7,27 ^{Aa}	9,02 ^{Aa}	7,72 ^{Aa}	11,10 ^{Aa}	8,65 ^{Aa}	$\pm 0,93$	
G ₃	8,97 ^{Aa}	9,97 ^{Aa}	6,15 ^{Aa}	10,57 ^{Aa}	10,22 ^{Aa}	$\pm 0,93$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem global de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

As médias da contagem de leucócitos não se diferenciaram, entre os grupos e nos diferentes tempos, pelo teste de Tukey, como demonstram a Tabela 7e a Figura 13.

Observou-se também que nos G₂ e G₃, houve uma tendência de aumento no T₂₈.

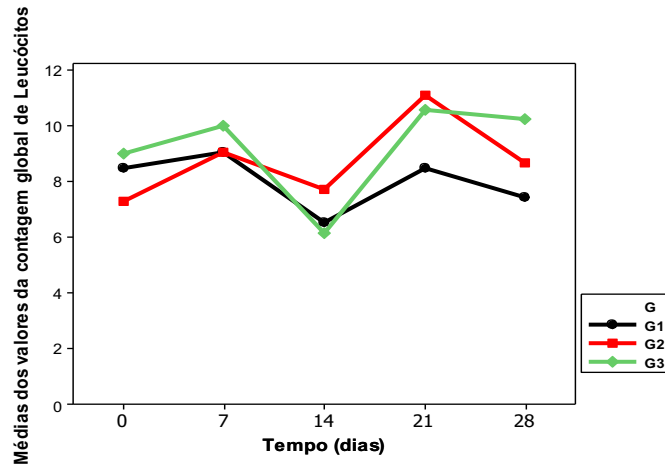


Figura 13. Valores médios da contagem de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).

Nas contagens diferenciais médias dos basófilos, neutrófilos bastonetes e neutrófilos segmentados, não apresentaram interações significativas entre grupos, nem entre tempos de colheita ($p < 0,05$), como seguem nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Valores médios para contagem de neutrófilos bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (célx10 ³ μL)
	Tempos		colheita		amostras (T)		
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	0,05 ^{Aa}	0,30 ^{Aa}	0,23 ^{Aa}	0,10 ^{Aa}	0,16 ^{Aa}	$\pm 0,05$	0 – 0,5
G ₂	0,06 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,04 ^{Aa}	0,02 ^{Aa}	0,04 ^{Aa}	$\pm 0,06$	
G ₃	0,00 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,12 ^{Aa}	0,01 ^{Aa}	0,20 ^{Aa}	$\pm 0,06$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem de neutrófilos bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO 1)

Tabela 9. Valores médios para contagem de neutrófilos segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (cél/sx $10^3 \mu\text{L}$)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G₁	4,85 ^{Aa}	7,22 ^{Aa}	4,86 ^{Aa}	6,32 ^{Aa}	4,13 ^{Aa}	$\pm 0,60$	3,6 – 13,8
G₂	4,25 ^{Aa}	5,06 ^{Aa}	3,75 ^{Aa}	5,00 ^{Aa}	5,96 ^{Aa}	$\pm 0,70$	
G₃	4,42 ^{Aa}	4,63 ^{Aa}	4,22 ^{Aa}	3,23 ^{Aa}	5,40 ^{Aa}	$\pm 0,70$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem de neutrófilos segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Tabela 10. Valores médios para contagem de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (cél/sx $10^3 \mu\text{L}$)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G₁	0,53 ^{Aa}	0,48 ^{Aa}	0,23 ^{Aa}	0,36 ^{Aa}	0,54 ^{Aa}	$\pm 0,15$	0,12 – 1,8
G₂	0,83 ^{Aa}	1,08 ^{Aa}	1,19 ^{Ba}	1,38 ^{Ba}	0,95 ^{Aa}	$\pm 1,17$	
G₃	1,00 ^{Aa}	0,45 ^{Aa}	0,44 ^{Aa}	0,70 ^{Aa}	0,46 ^{Aa}	$\pm 1,17$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Com relação aos valores médios de eosinófilos, houve uma queda em sua média a partir do 7º dia de experimento, nos G_1 e G_3 , sendo que no G_2 houve exatamente o contrário, elevando-se o número da média do número de eosinófilos a partir do mesmo período.

Tabela 11. Valores médios para contagem de linfócitos ($\times 10^3 \mu/L$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (célx $10^3 \mu/L$)
	Tempos		colheita		amostras (T)		
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G₁	3,15 ^{Aa}	1,29 ^{Aa}	1,20 ^{Aa}	1,53 ^{Aa}	2,54 ^{Aa}	$\pm 0,76$	0,72 – 5,4
G₂	1,79 ^{Aa}	2,72 ^{Aa}	2,59 ^{Aa}	4,57 ^{Aa}	1,55 ^{Aa}	$\pm 0,85$	
G₃	3,52 ^{ABab}	4,59 ^{ABab}	1,18 ^{Ab}	6,51 ^{ABa}	4,29 ^{ABab}	$\pm 0,85$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem de linfócitos ($\times 10^3 \mu/L$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Os valores médios possuíram diferenças para a contagem de linfócitos entre os grupos e também entre os tempos de colheita. No G_3 , houve uma diferença notável no 14º dia de colheita, onde essa média teve uma queda na média do grupo, sendo que no 21º dia de colheita houve uma elevação na média do número de linfócitos como demonstra a Figura 14.

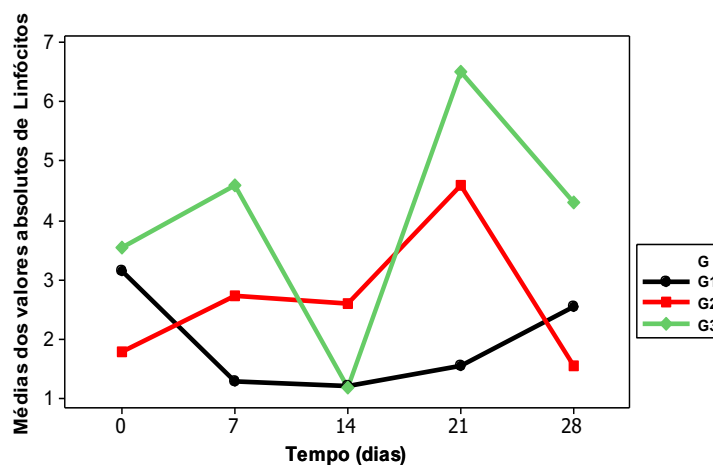


Figura 14. Valores médios para contagem de linfócitos ($\times 10^3 \mu/L$), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G_1 , G_2 e G_3).

Os valores médios para contagem de monócitos representados na Tabela 12 apresentaram-se com seus valores médios de grupos, G₂ e G₃, fora dos valores de referência, aumentados. Somente no G₁ as médias dos valores de monócitos apresentam-se dentro dos valores de referência. O gráfico representado pela Figura 15 ilustra o comportamento das diferentes médias dos valores de monócitos que não se diferenciaram estatisticamente. No G₃ particularmente, os valores médios de monócitos já encontravam-se aumentados a partir do 1° dia de colheita, T₀, normalizando-se no T₁₄, mas voltando a aumentar no restante do período experimental.

Tabela 12. Valores médios para contagem de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* (célx10 ³ μL)
	Tempos	colheita		amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	0,01 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,05 ^{Aa}	0,06 ^{Aa}	0,09 ^{Aa}	$\pm 0,02$	0,18 – 1,8
G ₂	1,79 ^{Aa}	2,72 ^{ACa}	2,59 ^{Aa}	4,57 ^{Aa}	1,55 ^{Aa}	$\pm 0,03$	
G ₃	3,52 ^{Aa}	4,59 ^{Ca}	1,18 ^{Aa}	6,51 ^{Aa}	4,29 ^{Aa}	$\pm 0,03$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO 1)

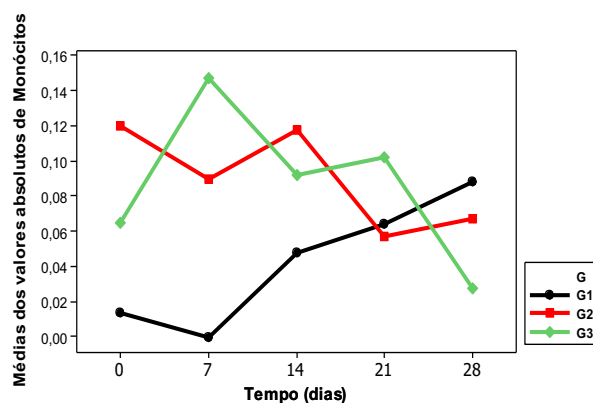


Figura 15. Valores médios para contagem de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}$), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).

Tabela 13. Valores médios para contagem de plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}$) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* ($\text{cél} \times 10^3 \mu\text{L}$)
	Tempos		colheita		amostras (T)		
	T_0	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}		
G_1	357,4 ^{Aa}	212,6 ^{Aab}	244,2 ^{Ab}	353,2 ^{Aab}	314,4 ^{Aab}	$\pm 18,2$	180 – 400
G_2	187,2 ^{Ba}	182,5 ^{Ba}	159,5 ^{Aa}	164,7 ^{Ba}	167,0 ^{Ba}	$\pm 20,3$	
G_3	200,0 ^{Ca}	204,0 ^{Ca}	143,7 ^{ABa}	213,2 ^{Ca}	226,0 ^{Aa}	$\pm 20,3$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência para contagem de plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}$) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

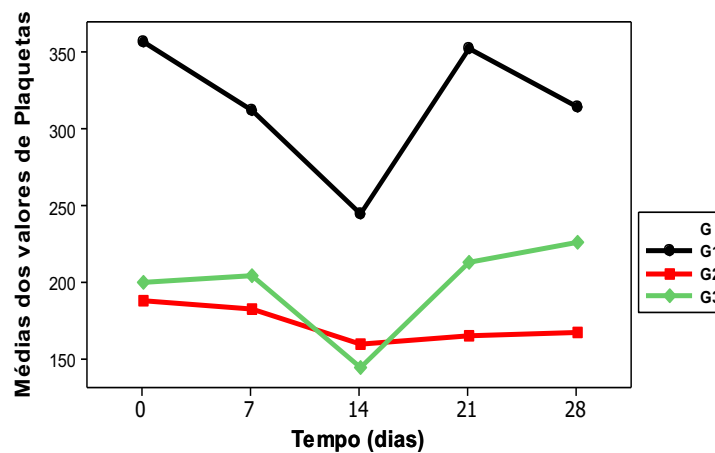


Figura 16. Valores médios para contagem de plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}$), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T_0 , T_7 , T_{14} , T_{21} e T_{28}) e nos diferentes grupos (G_1 , G_2 e G_3).

Os valores médios do número de plaquetas se mostraram inferiores no G_2 . As diferenças ocorreram nos grupos e nos tempos de colheita, segundo demonstra a Tabela 13. Houve uma diminuição no número médio de plaquetas nos 3 grupos, no 14^o dia de colheita, voltando a aumentar já nos sete dias posteriores, na colheita seguinte.

5.4 Avaliação do quadro bioquímico sérico

De acordo com o quadro bioquímico sérico, a única enzima que houve diferença nos valores médios entre grupos e tempos de colheita foi à enzima gama glutamiltransferase (GGT), enquanto outros exames bioquímicos apresentaram diferenças somente entre grupos, foram às proteínas totais (PT), a enzima fosfatase alcalina (ALP) e a enzima alanina aminotransferase (ALT). As médias dos outros dois exames bioquímicos executados, os metabólitos, creatinina e uréia não se diferiram (Tabelas 15, 16, 17, 18, 19 e 20).

Tabela 14. Análise de Variância dos valores médios das atividades séricas dos exames bioquímicos, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), creatinina, uréia e proteínas totais (PT), tendo como fontes de variação as análises: dos grupos, dos animais nos grupos, dos tempos, dos tempos pelos grupos, Coeficiente de Determinação (R^2) e do Coeficiente de Variação (CV), de cães intoxicados com diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis* por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Níveis Mínimos de					Significância(p)	
		ALP	ALT	GGT	Creatinina	Uréia	PT	
Grupo (G)	2	0,5 ^{ns}	0,05 ^{ns}	<.0001**	0,09 ^{ns}	0,3 ^{ns}	0,003**	
A(G)	10	<.0001**	<.0001**	0,98 ^{ns}	<.0001**	<.0001**	0,04*	
Tempo (T)	4	0,26 ^{ns}	0,5 ^{ns}	<.0001**	0,09 ^{ns}	0,4 ^{ns}	0,5 ^{ns}	
Tempo x Grupo (G*T)	8	0,61 ^{ns}	0,3 ^{ns}	<.0001**	0,73 ^{ns}	0,9 ^{ns}	0,2 ^{ns}	
Erro (b)	40	-	-	-	-	-	-	
R^2		0,96	0,7	0,9	0,7	0,7	0,7	
CV		20,8%	27,2%	21,8%	14,5%	22,7%	11,44%	

Médias seguidas pelos valores menores que 0,05 ($p < 0,05$) são valores significativos a 5% de probabilidade. (*)

Médias seguidas pelos valores maiores que 0,05 ($p > 0,05$) são valores não significativos a 5% de probabilidade. (ns)

Médias seguidas pelos valores menores que 0,01 ($p < 0,01$) são valores significativos a 1% de probabilidade. (**)

Tabela 15. Valores médios da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (U/L) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* GGT (U/L)
	Tempos colheita		amostras (T)				
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	7,65 ^{Aa}	7,65 ^{Aa}	7,65 ^{Aa}	7,65 ^{Aa}	7,65 ^{Aa}	\pm 1,20	1 – 10
G ₂	30,60 ^{Ba}	24,70 ^{Ba}	17,20 ^{Bb}	15,30 ^{Bb}	15,30 ^{Bb}	\pm 1,30	
G ₃	7,65 ^{ABa}	13,40 ^{ABa}	11,50 ^{Aa}	7,65 ^{ABa}	7,65 ^{ABa}	\pm 1,30	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).).*Valor de referência da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (U/L) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal.(ANEXO1)

As médias dos valores da enzima GGT diferenciaram-se tanto entre os grupos como entre os tempos de colheita, demonstrados pela Tabela 15 e Figura 18. Os valores médios da enzima GGT, permaneceram acima do valor de referência no G₂, no 1º dia de colheita, T₀, apresentando uma diminuição no T₇, mas ainda continuaram aumentadas segundo os valores de referência do laboratório de Patologia Clínica Veterinária do hospital veterinário Governador Laudo Natel. O G₃, ao 7º e 14º dia de colheita foram observados aumento na média dos valores de GGT, diminuindo ao 21º dia de colheita.

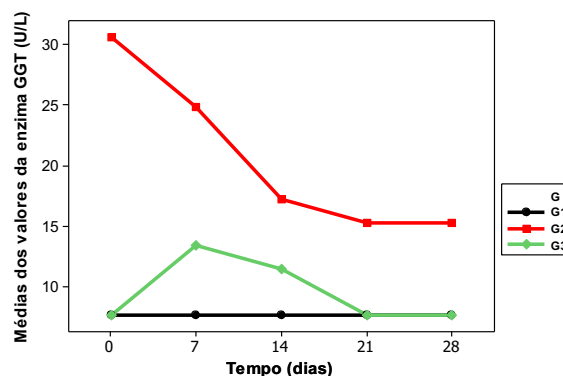


Figura 17. Valores médios da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (U/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T₀, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈) e nos diferentes grupos (G₁, G₂ e G₃).

Outro exame bioquímico que sofreu diferença entre grupos foi a PT. A Tabela 16 ilustra o resultado da interação significativa. O valor médio da atividade sérica da PT no G₂ no 1º dia de colheita, T₀, estava aumentado, segundo seu valor de referência e se manteve alta, durante todo período experimental. Já os G₁ e G₃ não apresentaram nenhum valor significativo no grupo (p>0,05).

Tabela 16. Valores médios da atividade sérica de proteínas totais (g/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* PT(g/dL)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	7,25 ^{Aa}	6,43 ^{Aa}	6,33 ^{Aa}	6,68 ^{Aa}	5,79 ^{Aa}	$\pm 0,36$	5,8 – 7,9
G ₂	8,19 ^{Aa}	7,94 ^{Aa}	7,91 ^{Aa}	8,33 ^{Aa}	8,24 ^{Ba}	$\pm 0,4$	
G ₃	6,34 ^{Aa}	7,07 ^{Aa}	7,52 ^{Aa}	7,07 ^{Aa}	6,63 ^{Aa}	$\pm 0,4$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% (p<0,05). *Valor de referência da atividade sérica de proteínas totais (g/dL) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Tabela 17. Valores médios da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (U/L) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* ALP (U/L)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	64,70 ^{Aa}	66,30 ^{Aa}	64,80 ^{Aa}	72,90 ^{Aa}	79,60 ^{Aa}	\pm 4,65	20 – 150
G ₂	45,60 ^{Aa}	43,50 ^{Aa}	39,40 ^{Ba}	43,50 ^{Ba}	41,40 ^{Ba}	\pm 5,20	
G ₃	29,00 ^{ABa}	29,00 ^{ABa}	35,20 ^{Ca}	31,10 ^{Ca}	39,40 ^{Ca}	\pm 5,20	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (U/L) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Os valores médios da atividade sérica da enzima ALP não se apresentaram fora dos valores de referência, mas houve diferenças dentro dos grupos como demonstra a Tabela 17. Os G₁ e G₃ apresentaram uma elevação no valor médio da enzima no 28° dia de colheita.

Tabela 18. Valores médios da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (U/L) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* ALT (U/L)
	Tempos		colheita	amostras (T)			
	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈		
G ₁	33,50 ^{Aa}	35,50 ^{Aa}	37,70 ^{Aa}	36,60 ^{Aa}	32,50 ^{Aa}	\pm 3,40	10 – 88
G ₂	31,40 ^{Aa}	47,10 ^{Aa}	32,70 ^{Aa}	45,80 ^{Aa}	39,30 ^{Aa}	\pm 4,40	
G ₃	22,20 ^{Aa}	18,30 ^{ABa}	22,20 ^{Aa}	22,20 ^{ABa}	23,50 ^{Aa}	\pm 4,40	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (U/L) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

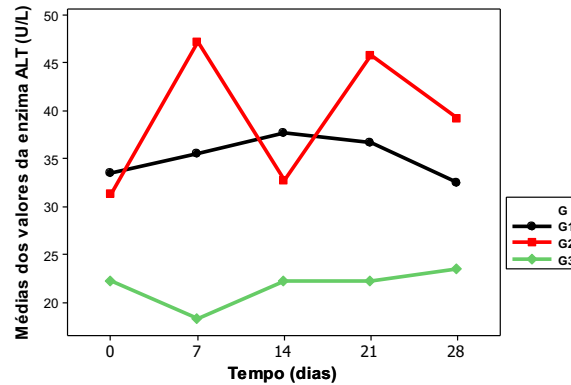


Figura 18. Valores médios da atividade sérica da enzima alanina aminotransferase (U/L), de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T_0 , T_7 , T_{14} , T_{21} e T_{28}) e nos diferentes grupos (G_1 , G_2 e G_3).

O G_2 apresentou um aumento no 7º e 21º dia de colheita, não sendo significativo ao final do período experimental. Portanto, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para os valores médios da atividade sérica da enzima ALT. Todos os valores das médias estão dentro dos valores de referência para espécie, como demonstra Tabela 18 e Figura 18.

Tabela 19. Valores médios da atividade sérica do metabólito creatinina (mg/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G_1 , G_2 , e G_3), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* Crea (mg/dL)
	Tempos		colheita		amostras (T)		
	T_0	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}		
G_1	1,13 ^{Aa}	1,13 ^{Aa}	0,96 ^{Aa}	1,13 ^{Aa}	1,06 ^{Aa}	$\pm 0,06$	0,5 – 1,5
G_2	0,85 ^{Aa}	0,90 ^{Aa}	0,86 ^{Aa}	1,02 ^{Aa}	0,98 ^{Aa}	$\pm 0,07$	
G_3	0,80 ^{Aa}	0,83 ^{Aa}	0,75 ^{Aa}	0,86 ^{Aa}	0,94 ^{Aa}	$\pm 0,07$	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).).*Valor de referência da atividade sérica do metabólito creatinina (mg/dL) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Tabela 20. Valores médios da atividade sérica do metabólito uréia (mg/dL) e erro padrão médio (\pm EPM), de cães submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁, G₂, e G₃), a intervalos semanais, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2010.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)					Erro Padrão Médio (EPM)	Valor de Referência* Uréia (mg/dL)
	Tempos T ₀	de T ₇	colheita T ₁₄	de T ₂₁	amostras (T) T ₂₈		
G ₁	33,00 ^{Aa}	28,00 ^{Aa}	31,80 ^{Aa}	33,50 ^{Aa}	37,40 ^{Aa}	\pm 3,00	15 – 65
G ₂	29,70 ^{Aa}	30,90 ^{Aa}	29,00 ^{Aa}	30,70 ^{Aa}	32,60 ^{Aa}	\pm 3,40	
G ₃	22,20 ^{Aa}	23,20 ^{Aa}	24,40 ^{Aa}	28,20 ^{Aa}	25,20 ^{Aa}	\pm 3,40	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). *Valor de referência da atividade sérica do metabólito uréia (mg/dL) em cães segundo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP, Jaboticabal. (ANEXO1)

Segundo os valores médios encontrados para as enzimas creatinina (Tabela 19) e uréia (Tabela 20), não foram encontrados resultados significativos ($p > 0,05$) e os valores se encontram dentro dos valores de referência para espécie.

5.5 Avaliação histopatológica

Foram encontradas inúmeras alterações microscópicas, em todos os grupos, mas com intensidades diferentes que estão citadas na Tabela 21.

Tabela 21. Descrição dos achados histológicos de biópsia hepática de cães, em diferentes intensidades de lesões, submetidos à intoxicação experimental, com diferentes dosagens de *C. spectabilis* (G₁, G₂ e G₃), a intervalos pré experimental e experimental, (T₀, T₁₄ e T₂₈).UNESP, Jaboticabal, 2010.

Achados histológicos (lesões)	G₁	G₂	G₃
Hepatócitos tumefeitos (Degeneração Hidrópica)	++	+++	++++
Vacuolização de células presentes nos sinusóides	+++	++	+
Necrose focal (ausência de núcleos)	+	++	+++
Linfócitos, plasmócitos + macrófagos pigmento região Peri portal	++	++	++++
Anisocitose	+	+	++
Cariomegalia	++	++	+
Células de Kupffer com núcleo de coloração cinza a esverdeado	++	++	-
Leucócitos em região perivascular	++	++	+++
Fibrose (aumento de matriz extra celular)	++	+++	++++
Proliferação ductal			
Deposição de colágeno em vasos sanguíneos	++	+++	++++
Presença pigmento biliar nos hepatócitos e nos sinusóides (colestase)	-	-	++
Presença de nucléolos no núcleo dos hepatócitos	-	-	+++

Critério: - sem lesão, + discreto, ++ discreto a moderado, +++ moderado, ++++ moderado a severo, +++++ severo

As lesões que obtiveram mais destaque foram: hepatócitos tumefados devido à degeneração hidrópica (Figura 19), vacuolização de células presentes nos sinusóides, sugestivo células Ito (Figura 22B), acúmulo de linfócitos e plasmócitos associados a macrófagos contendo pigmento anofílico em seu citoplasma presente na região periportal (Figura 20), necrose focal evidenciando ausência de núcleo nos hepatócitos, anisocitose (Figura 22A), cariomegalia na tentativa de regeneração, células de Kupffer com núcleo de coloração cinza a esverdeado, sugestivo de hemossiderina (Figura 21B). Constata-se também presença de uma grande quantidade de leucócitos em região perivascular, aumento de matriz extracelular (região mais clara evidenciando fibrose) e ainda presença de tecido conjuntivo, deposição de colágeno com aumento de vasos e discreta proliferação ductal (Figura 23).

No G₃ onde os animais receberam a maior quantidade das sementes de *C. spectabilis* observou a presença de pigmentos biliares nos hepatócitos e nos sinusóides, sugestivo colestase hepática, em uma grande quantidade de animais (Figura 25). Notou-se que as áreas de fibrose estavam mais extensas e havia uma grande quantidade de hemácias, evidenciando focos de hemorragia, a presença de nucléolos nos núcleos de hepatócitos em grande quantidade em todos os animais, bem evidenciados (Figura 24).

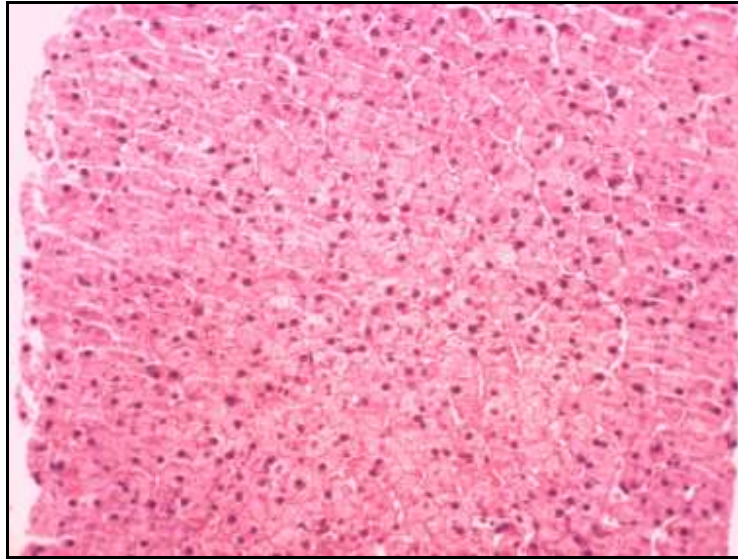


Figura 19. Fotomicrografia de fígado de cão, que será intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T_0 de intoxicação), apresentando discretíssima tumefação dos hepatócitos devido a início de degeneração hidrópica, Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.

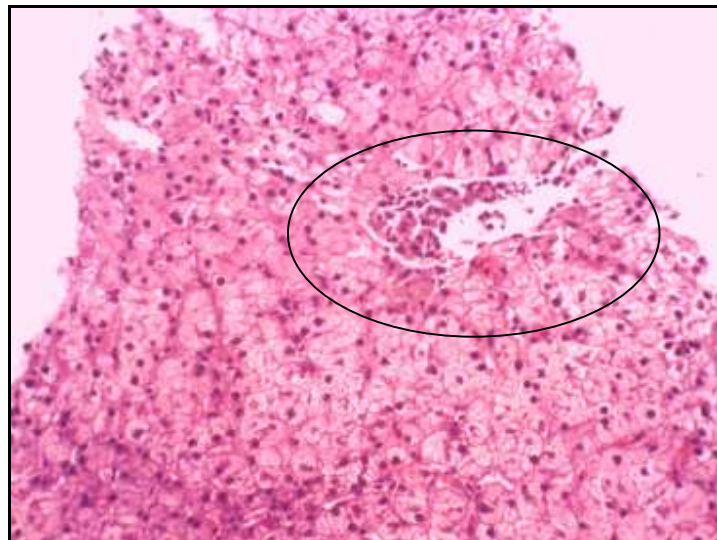


Figura 20. Fotomicrografia de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis*, (T_{14} de intoxicação) Tumefação difusa de hepatócitos com pobre evidência dos sinusóides. Discreto acúmulo de linfócitos e plasmócitos associados a macrófagos, contendo pigmento anofílico em seu citoplasma presente na região peri-portal (detalhe). Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.

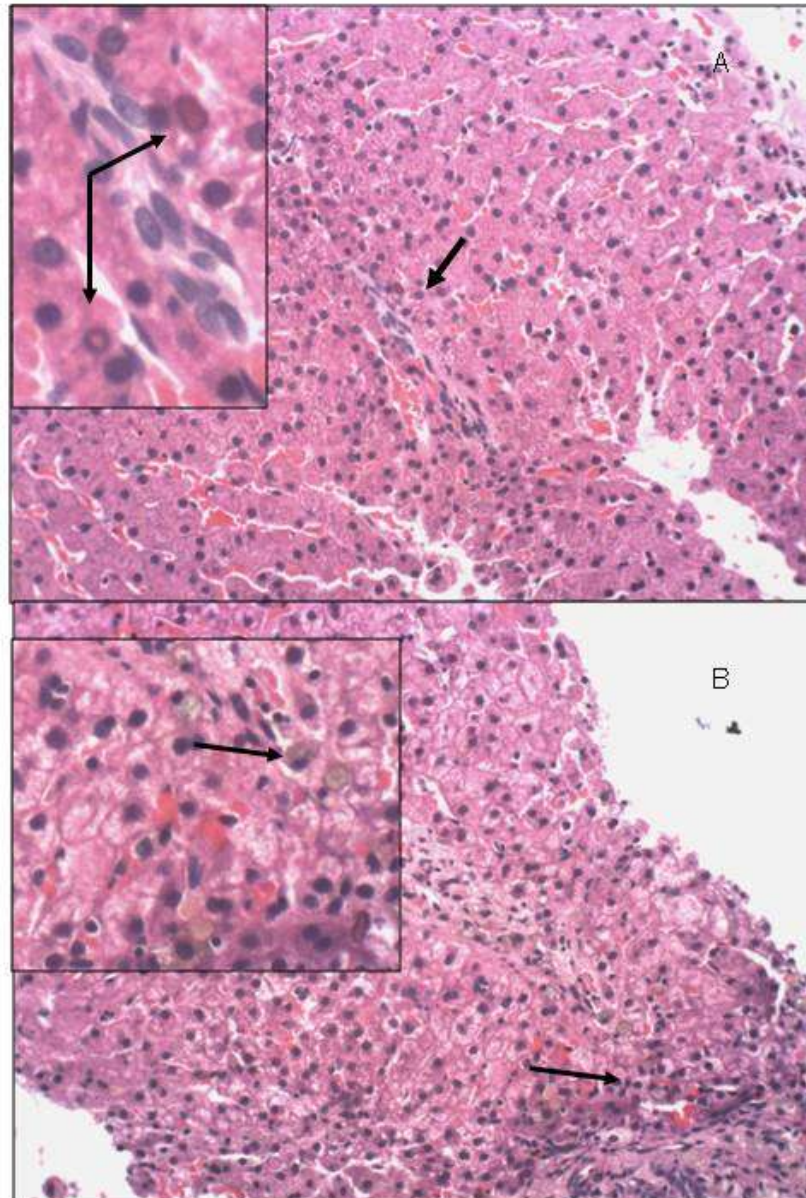


Figura 21. Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria Spectabilis* (T₁₄ de intoxicação) (A) Núcleo do hepatócito apresentando pigmento avermelhado (detalhe – seta), agregado de linfócitos nos sinusóides (B) (T₂₈ de intoxicação) células de Kupffer apresentando um pigmento esverdeado (seta) e o padrão dos hepatócitos é de degeneração grau moderado bem tumefeitos. Hematoxilina e Eosina .Obj. 40x.

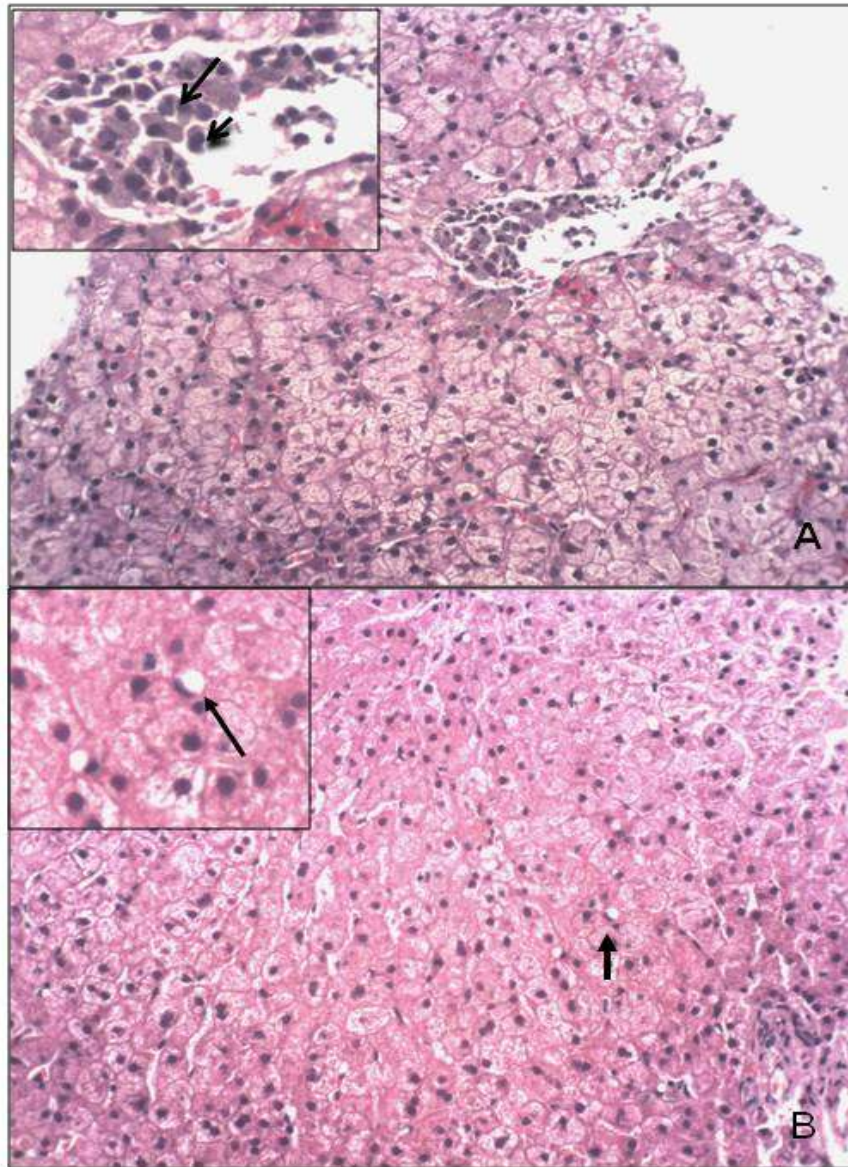


Figura 22. Fotomicrografia do fígado de cão na intoxicação com sementes *Crotalaria spectabilis* (T₁₄ de intoxicação) (A) Hepatócitos tumefeitos devido à degeneração hidrópica, em região peri-portal, anisocariose (setas – diferentes tamanhos de núcleos). (B) Vacuolização de células presentes nos sinusóides sugestivo de células Ito. Hematoxilina e Eosina .Obj. 40x.

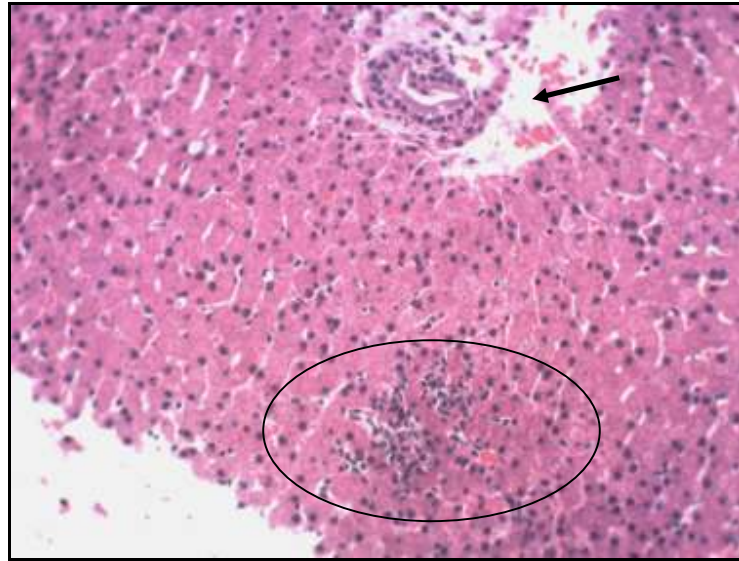


Figura 23. Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₁₄ de intoxicação). Presença de células Ito bem sutis, células de Kupffer apresentando pigmento acastanhado, agregado de linfócitos nos sinusóides (detalhe), vaso sanguíneo apresentando aumento de matriz extracelular (detalhe- seta) e discreta proliferação ductal. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.

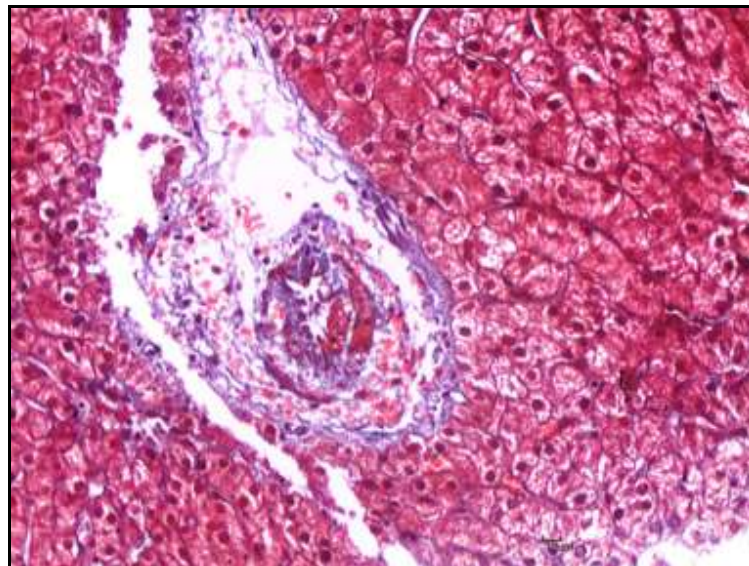


Figura 24. Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₂₈ de intoxicação). Área de fibrose e hemorragia ao redor de vaso sanguíneo. Tricrômio de Masson. Obj. 20x.

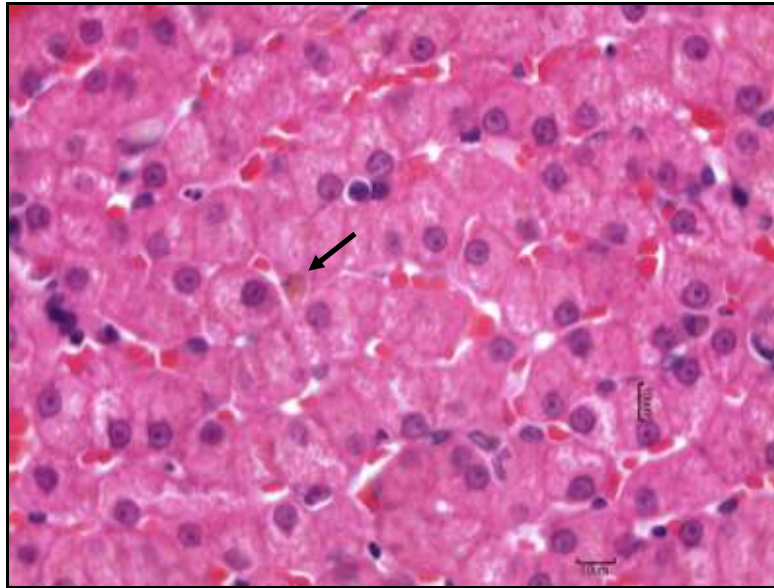


Figura 25. Fotomicrografia do fígado de cão intoxicado com sementes de *Crotalaria spectabilis* (T₂₈ de intoxicação). Degeneração hidrópica moderada, presença de pigmento biliar no hepatócito, sugestivo colestase hepática (detalhe – seta), presença de nucléolos nos núcleos dos hepatócitos. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40x.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que as sementes de *Crotalaria spectabilis*, trituradas e incluídas à ração de cães no tempo de quatro semanas (28 dias), foram tóxicas para espécie estudada (G_1 – 0,2%, G_2 – 0,4% e G_3 – 0,6%).

Os padrões de alopecia (periocular e difusa) identificados nos animais deste experimento também foi descrito em suínos por TORRES et al. (1997). Estes autores forneceram sementes de *C. spectabilis* a 1% e 5%, misturadas a ração dos animais por um período de 32 dias. EMMEL (1935) e PECKHAN et al. (1974) afirmaram que perdas seletiva de pêlos pretos são considerados sinal característico de *C. spectabilis* em suínos. MELO (2010) trabalhou com eqüinos, e estes também apresentaram alopecia com prurido e apresentaram secreção nasal mucosa. CHEEKE (1988) citou que provavelmente essas lesões seriam efeito de uma fotossensibilização secundária, uma vez que 80% do fígado ou mais é destruído por esses alcalóides, não existindo liberação da filoteritina, um produto de decomposição bacteriana, pelo fígado. O autor ainda comenta o acúmulo da filoteritina nos vasos sanguíneos dos animais e, quando expostos a luz ultravioleta ou fluorescente, provoca danos oxidativos nos vasos sanguíneos e na pele causando alopecias. Os resultados encontrados por BAILEY (1978) sugeriu no Texas, USA, quando trabalhou com diferentes rebanhos, um possível tratamento consistiria no controle dessas plantas sensibilizantes.

Outros sinais clínicos encontrados nos cães deste experimento foram secreção ocular serosa, secreção nasal mucosa bilateral, hiperkeratose nasal, espirros, tosse, vômitos esporádicos, tenesmo e constipação. Com relação à tosse e espirros, outros autores, a exemplo de TORRES et al. 1997, também observaram os mesmos sinais clínicos trabalhando com outra espécie animal. MANAGER (1989) estudou crianças intoxicadas com sementes de *C. spectabilis* encontrados em cereais matinais e também encontrou sinais clínicos similares, vômitos, constipação e aumento de volume abdominal. BOGHOSSIAN et al. (2007) trabalharam com bovinos intoxicados experimentalmente e se deparou com secreção nasal unilateral e constipação, concordando com os achados encontrado neste trabalho em cães. Os sinais clínicos

mais comuns que aparecem em outras espécies animais e não apareceram na espécie canina foram decréscimo nos reflexos dos nervos cranianos, ataxia, fraqueza, prolapso retal, depressão, icterícia, incoordenação e decúbito. Esses sinais não foram encontrados na espécie canina devido o tempo utilizado dessas sementes, sendo outras espécies animais citadas, o tempo e as doses de administração da semente foram muito maiores. Trabalhos experimentais em ratos demonstraram que altas concentrações de proteínas na dieta reduzem a toxicose dos alcalóides, em virtude de que aminoácidos como a glutatona, exercem importante papel na rota de detoxificação hepática dos alcalóides pirrolizidínicos (CHEEKE, 2009).

O peso corpóreo (Kg) dos animais não revelou diferença significativa nas doses estudadas ao final dos 28 dias, sendo provável explicação a susceptibilidade da espécie estudada ou até mesmo a dose administrada ser muito baixa. Fato também observado pelos resultados encontrados por MELO (2010). Por outro lado em suínos SOUZA (1996) e TORRES et al. (1997) verificaram perda de peso em seus animais. Em galinhas poedeiras houve severa perda de peso observado por PEREIRA (2006) assim como os resultados encontrados por BOGHOSSIAN et al. (2007) em bovinos. Diferenças entre as espécies animais no que se refere à suscetibilidade a intoxicação por APs são relatadas na literatura. A resistência de algumas espécies é o resultado do balanço entre as reações de bioativação, desintoxicação e excreção dos alcalóides (HOOPER, 1978). Além desses fatores, a qualidade da dieta do animal aparentemente influencia no processo de detoxificação dos APs (CHEEKE, 1994).

Os exames hematológicos demonstraram diferenças significativas nos valores médios da contagem de hemácias ($p < 0,05$), com queda observada no G_1 em relação aos tempos de colheita que tiveram tendência a queda ao longo do período experimental, porém, por outro lado se mantiveram dentro da faixa dos valores de referência para a espécie. Esse fato se deve, possivelmente, pela própria intoxicação como agente seqüestrante das hemácias. Outra possível explicação seria o seqüestro dessas hemácias pelo baço em virtude no anestésico utilizado nas biópsias hepáticas. Ambas as explicações se referem para a taxa de hematócrito. Trabalhos desenvolvidos por NAKAGE et al. (2000) em frangos de corte mostraram que os valores de hemácias,

hemoglobina e hematócrito aumentaram significativamente na fase inicial do experimento. Os valores médios da taxa de hemoglobina (g/dL) não apresentaram diferença significativa entre os tempos de colheita dentro de cada grupo ($p > 0,05$). Em trabalhos realizado por ALFONSO et al. (1993), intoxicando frangos e gansos, o valor médio da taxa de hemoglobina foi reduzido de forma significativa.

Os valores médios da contagem de leucócitos, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). O mesmo resultado foi encontrado em suínos por Souza (1996). MELO (2010) intoxicando eqüinos com sementes de *C. spectabilis* observou uma ligeira leucopenia, com o passar de 21 dias, observando que somente alguns animais retornaram aos valores normais de referência ao final do experimento.

Valores médios de linfócitos apresentaram com diferenças significativas entre grupos e tempos de colheita ($p < 0,05$). O G_3 apresentou uma linfocitose em relação à média dos G_1 e G_2 . Fato esse explicado por um stress orgânico desses animais no momento de colheita. Sabe-se que a estimulação antigênica prolongada, que pode aparecer em infecções crônicas, estimula a produção linfocitária e a hiperplasia linfóide, provocando um aumento de linfonodos e conseqüentemente uma ligeira e repentina elevação na contagem de linfócitos ou uma contagem no limite superior (BUSH, 2004). ALFONSO et al. (1993) não encontraram aumento em relação à média da contagem diferencial de leucócitos, mas uma diminuição em frangos e gansos. No valor médio da contagem diferencial de monócitos houve uma diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$), causando monocitose nos tempos dos G_2 e G_3 . Uma possível explicação seria a monocitose fisiológica, devido ao stress, pois no T_0 os animais já apresentavam valores acima aos de referência. A média da contagem do número total de plaquetas, também sofreu alterações significativas entre os grupos ($p < 0,05$). O G_1 foi o grupo que manteve as médias mais elevadas no período do experimento sendo o único a apresentar diferença entre os tempos de colheita T_0 e T_{14} . Os outros tempos mantiveram-se com as médias estáveis, com uma tendência a diminuição, sendo que o G_2 já apresentou-se no início do experimento com trombocitopenia, fato esse distendido por todos os momentos de colheita do período experimental. Essa trombocitopenia pode ser explicada pela própria toxicidade da planta ingerida pelos animais. Defeitos na função

plaquetária de cães podem ser secundários a doenças hepáticas, há casos de trombocitopenias pela toxicidade de algumas drogas por supressão da medula óssea pelo princípio tóxico (BUSH, 2004).

Nos exames bioquímicos, os valores médios da enzima GGT encontraram-se elevados nos G₂ e G₃. O valor médio basal (T₀) da enzima GGT para o G₂ encontrou-se elevada, sendo difícil avaliar os outros tempos. Já no G₃, os aumentos foram além do valor de referência nos T₇ e T₁₄, normalizando-se ao T₂₈, mas não se diferindo significativamente. A enzima GGT é considerada uma enzima de indução (THRALL, 2007) e lesões hepáticas agudas pode levar ao aumento imediato da atividade sérica dessa enzima pela liberação de fragmentos de membrana que contém GGT, lesões no endotélio biliar e lesões de hepatócitos (THRALL, 2007; BUSH, 2004). No caso de colestase há aumento de produção e liberação com conseqüente aumento dos valores enzimáticos e da maior solubilização da GGT aderida a membrana celular (THRALL, 2007). Segundo UNDERWOOD & SUTTLE (2001) aumentos nos níveis de GGT indicam lesões muito antigas nos ductos biliares. MELO (2010) encontrou valores aumentados da enzima GGT, em eqüinos. SOUZA (1996) trabalhando com intoxicação experimental de *C. spectabilis* em suínos e PEREIRA (2006) em poedeiras, não encontrou valores de GGT elevados, mas por outro lado os valores séricos da enzima aspartato aminotransferase (AST), que em suínos é considerada a enzima de predileção para danos na funcionalidade hepática, apresentaram elevações significativas. MEDEIROS et al, (1999) relataram que essas diferenças entre os valores médios dos exames bioquímicos estão associadas aos níveis microssomais no fígado, existindo muitas evidências que existe uma grande resistência individual quanto à toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos.

Já em animais de companhia, a enzima hepática que se destaca por detectar danos celulares hepáticos é a enzima ALT. Aumentos de sua atividade sérica indicam danos em hepatócitos, com liberação da enzima para circulação, e entre os testes mais comuns é considerado o melhor para a detecção hepática em cães. Este não se trata de um teste de função hepática, não existindo isoenzimas específicas, pequenos aumentos na sua atividade sérica não têm relevância. O grau da lesão pode variar de

moderada a reversível, suficiente para permitir a passagem da enzima através da membrana celular, sem perda da funcionabilidade celular. O aumento da atividade enzimática é aproximadamente proporcional ao número de células lesionadas e não a gravidade da lesão (BUSH, 2004). THRALL (2007) menciona que essas enzimas de extravasamento e indução de lesão podem aumentar em vários tipos de doenças hepáticas, a intensidade relativa desse aumento pode nos fornecer indícios de lesão hepática primária.

No experimento realizado foi observado que as médias da atividade sérica da enzima ALT não sofreram alterações sendo somente possível notar o aumento de fosfatase alcalina nos casos de colestase aguda.

A proteína total por sua vez não foi observado diferenças significativas entre os tempos de colheita. O G₂ apresentou valor médio de PT e valor basal (T₀) acima aos valores de referência para a espécie estudada, podendo ser explicado por uma possível alteração de ordem fisiológica como stress ou também a susceptibilidade desses grupo à semente, que por servir como fonte de nitrogênio para o solo é uma fonte altamente protéica.

As lesões histopatológicas encontradas no fígado dos cães no período experimental desse estudo em todos os grupos foram: hepatócitos tumefados por degeneração hidrópica; vacuolização de células presentes nos sinusóides, sugestivo células Ito; acúmulo de linfócitos e plasmócitos associados a macrófagos contendo pigmento anfilico em seu citoplasma presente na região peri-portal; necrose focal evidenciando ausência de núcleo nos hepatócitos; anisocitose; cariomegalia na tentativa de regeneração; células de Kupffer com núcleo de coloração cinza a esverdeado, sugestivo de hemossiderina; presença de uma quantidade grande de leucócitos em região perivascular; aumento de matriz extracelular; presença de tecido conjuntivo pela deposição de colágeno nos vasos com discreta proliferação ductal. As lesões acima mencionadas nesse estudo encontradas no fígado dos cães intoxicados experimentalmente com sementes de *C. spectabilis* se assemelham as lesões encontradas por outros autores, com diferentes animais e em diferentes porcentagens das sementes tóxicas (EMMEL, 1935; BAILEY, E. M. 1978; CHEEKE & SHULL, 1985;

MATTOCKS, 1986; CHEEKE, 1988; BURROWS, 1991; SEAWRIGHT et al. 1991; ALFONSO et al. 1993; CHEEKE, 1994; SOUZA, 1996; SCHULTZE et al. 1996; TAYLOR et al. 1997; HATAYDE et al. 1997a; HATAYDE et al. 1997b; MEDEIROS et al. 1999; HANUMEGOWDA et al. 2003; COPPLE et al. 2002; COPPLE et al. 2003; FU et al. 2002; RADOSTITS et al. 2002; WANG et al. 2005; PERREIRA, 2006; MELO 2010).

'De acordo com FU et al. 2002 as lesões provocadas aos hepatócitos devido a diversas substâncias tóxicas podem ser reversíveis ou irreversíveis dependendo do grau da lesão que é causada na membrana basal das células hepáticas. Nos hepatócitos em megalocitose, estas células dificilmente irão morrer e a tendência fisiológica normal é a substituição por tecido conjuntivo fibroso, o que evidencia um processo de evolução mais crônica. Porém, isso ocorrerá se os agentes químicos agressores estiverem em quantidades elevadas ou existir exposição contínua. Assim, essas células hepáticas podem morrer em grande número em uma distribuição difusa, levando a insuficiência do órgão sem que ocorra tempo hábil para formação de fibrose para o processo de reparação. Da mesma forma, lesões que afetem as células das vias biliares, direta ou indiretamente, podem induzir tanto a morte rápida destas células, bem como estimular a sua proliferação de uma maneira desordenada na tentativa de recuperar as suas funções normais, citado por CHEEKE et al. (1988). A matriz extracelular desempenha um papel importante em lesões hepáticas crônicas e tem sido estudada em modelos de intoxicação experimental por TORRES & COELHO (2008). CHEEKE et al. (1988) e TORRES & COELHO (2008) afirmam ser a fibrose hepática formada pelo evento de reparação do parênquima hepático.

A principal fonte de excesso de colágeno na cirrose são as células Ito que residem no espaço de Disse. Embora funcionem normalmente como células armazenadoras de vitamina A e lipídios, as células Ito são ativadas durante o desenvolvimento da fibrose e transformam-se em células semelhantes à miofibroblastos. Esta transformação aumenta a resistência vascular dentro do parênquima hepático, pois a contração tônica destas células restringe os canais vasculares sinusoidais. Através do processo de lesão e fibrose hepáticas, os hepatócitos remanescentes são estimulados a se regenerar e se proliferam como

nódulos esféricos dentro dos limites dos septos fibrosos (nódulos regenerativos). O resultado final é um fígado fibrótico nodular onde as células parenquimatosas estão circundadas por intensa formação de tecido conjuntivo estando incapacitadas de comunicação com outros hepatócitos e com as vias biliares próximas, tornando esta nova formação celular inútil do ponto de vista fisiológico (TORRES & COELHO, 2008).

Outros órgãos como pulmões, rins, pâncreas, trato gastrintestinal, medula óssea e cérebro não foram avaliados em cães, mas sendo citados em outros trabalhos (SEAWRIGHT et al. 1991; FU et al. 2002; FLETCHER et al. 2009).

CHEECKE (1988) relatou que a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos causados no fígado dos animais são na maioria das vezes irreversíveis, metabolizados nas células parenquimais, nos hepatócitos, especialmente pela zona três, região centro lobular, onde foram encontradas a maioria das lesões na espécie canina.

Evidenciaram-se nos achados histopatológicos nos cães a presença de pigmentos biliares nos hepatócitos e nos sinusóides, sugerindo colestase hepática e a presença de nucléolos nos núcleos de hepatócitos, fato esse não encontrado em outras espécies citadas anteriormente.

Ressalta-se ao final deste estudo a necessidade de pesquisas sobre a espécie animal em questão, com novos exames e novas concentrações, por se tratar de um assunto com pouco, nenhum, trabalho realizado pela comunidade científica e, por conseqüência, na literatura.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos durante o período experimental podemos concluir que:

- Os cães apresentaram em maior ocorrência os sinais clínicos alopecia periocular e difusa;
- No quadro hematológico não foi verificado diferença entre grupos e tempos de colheita, nas diferentes doses;
- Nos exames bioquímicos não houve comprometimento hepático e renal;
- Podemos afirmar que as lesões histológicas encontradas no fígado, são compatíveis com intoxicação, indicando ser o principal meio de diagnóstico em cães intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*.
- Cães são intoxicados pela ingestão das sementes de *Crotalaria spectabilis*, trituradas e adicionadas à ração, nas dosagens de 0,2%, 0,4% e 0,6% em 28 dias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. R.; *Crotalaria spectabilis* toxicity studies in turkeys. **Avian Diseases**, v. 7, n. 3, p. 318-324, 1963.

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**, v. 35, n. 6, p. 539, 1993.

BAILEY, E. M. Physiologic responses of livestock to toxic plants. **Journal of Range Management**, v. 35, n. 5, p. 343-347, 1978.

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**, v. 27, n. 4, p. 149-156, 2007.

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. 210p.

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

BURROWS ,G. E. The Identification of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid exposure in horses by the demonstration of sulphur - bound pyrrolic metabolites on their hemoglobin. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 286-87, 1991.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínico de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 376.

CARSTENS, L. A.; ALLEN, J. R. Arterial degeneration and glomerular dyalinizatuion in the kidney of monocrotaline-intoxicated Rats. **American Journal of Pathology.**, v. 60, p. 75-90, 1970.

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

CHEEKE, P. R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 2343-2350, 1988.

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. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 36, p.240-247, 1994.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicans in feeds, forages, and poisonous plants.** 2 ed., Interstate Danville: Illinois,1998. 479p.

CHEEKE, P. R. Nutritional implications of pirrolizidine alkaloids toxicoses proceedings. In: **International Simphosium of Poisonous Plants**, 8., João Pessoa, Paraíba, 2009.

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

Companhia Integrada de Desenvolvimento de Santa Catarina, www.cidasc.sc.gov.br, 01/04/2008, 11:00.

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**, v. 65, p. 309-318, 2002.

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

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**, v. 77, p. 172 -182, 2004.

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

DUARTE, A. L. L. **Biópsia hepática guiada por videolaparoscopia em caprinos**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV-UNESP Jaboticabal, 2007.

EMMEL, M. W. Livestock Poisoning by *Crotalaria spectabilis*. **Veterinary Medicine**, p. 255-256, 1943.

FIGUEREDO, M. L. A., RODRIGUEZ, J., ALFONSO, H. A. Patologia de la intoxicacion experimental aguda por *Crotalaria retusa* y *C. spectabilis* em pollos. **Revista Ciência. Veterinária**, v. 18, n. 1/2, p. 63-71, 1987.

FINCO, D. R. Kidney function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. São Diego: Academic Press, 1997. p. 441-484.

FLETCHER, M. T.; MCKENZIE, R. A.; BARRY, J. B.; REICHMANN, K. G. Pyrrolyzidine alkaloids in *crotalaria* taxa from Northern Australia: risk to grazing livestock. **J. Agric. Chem.**, n. 57, p. 311-319, 2009.

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.

GARRIDO, M. S.; SOARES, C. F.; COIMBRA, J. L.; SOUSA, C.S. Management of crotalaria and pigeon pea for control of yam nematode diseases. **Summa Phytopatology**, v.34, n. 3, p. 222-227, 2008.

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**, v. 76, p. 237-246, 2003.

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, p.332-336, 1997a.

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**, v. 49. p. 239-249, 1997b.

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

HAYASHI, Y., LALICH, J. J. Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline. **Proceedings of Society Experimental Biology and Medicine**, v.124, p. 392-396, 1967.

HEINRICHS, R.; VITTI, G .C.; MOREIRA, A.; FIGUEIREDO, P., A., M.; FANCELLI, A. L.; CORAZZA, E. J. Características químicas de solo e rendimento de fitomassa de adubos verdes e de grãos de milho, decorrente do cultivo consorciado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 1, p. 71-79, 2005.

HOOPER, P. T. Pyrrolizidine alkaloid poisoning with particular reference to differences in animal and plant species. In: KEELB, R. F., VANKAMPEN, K. R., JAMES, L. F. **Effects of poisoning plants on livestock**. New York: Academic Press, 1978, p.161-176.

HOOPER, P. T.; SCANLAN, W. A. *Crotalaria retusa* poisoning of pigs and poultry. **Australian Veterinary Journal**, v.53, p.109-14, 1977.

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

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 Agricultural Food Chemical**,v. 33, n.1, p. 50-55, 1987.

JOLY, A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 4 ed., São Paulo: Editorial Nacional, 1977. p.381-2.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C. **Pathology of domestic animals**. 2ed., New York: Academic Press, 1970. p.216-219.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6° ed., São Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KAY, J. M.; HEATH, D. Observation on pulmonary arteries and heart weight of rats feed on *Crotalaria spectabilis* seeds. **Journal Pathology and Bacteriology**, v.92, p.385-394, 1966.

KAY, J. M.; GILLUND, T. D.; HEATH, D. Mast cells in the lungs of rats fed on *Crotalaria spectabilis* seeds. **American Journal of Pathology**, v. 51, n. 6, p. 1031-1044, 1967.

KIM, H. Y.; STERMITZ, F. R.; WILSON, D. W.; TAYLOR, D.; COULOMBE R. A. Characterization of pirrolizidine alkaloids induced DNA protein cross link. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 2691-2697, 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° ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 303-25.

LEE, Y. S.; BYUN, J. KIM, J. A.; LEE, J. S.; KIM, K. L.; SUH, Y. L.; KIM, J. M.; JANG, H. S.; LEE, J. Y.; SCHIN, I. S.; SUH, W.; JEON, E. S.; KIM, D. K. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 37, n. 1, p. 27-35, 2005.

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

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

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

MATTOCKS, A. R. **Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids**, Academic Press: London, 1986, 393p.

MEYRICK, B. Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. **American Journal of Pathology**, v. 94, p.37-50, 1979

McLEAN, E. K. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Pharmacology Review**, v.22, p.429-483, 1970.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIAK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brasilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 137-145, 1999.

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. **Rev. Educ. Contin.**, São Paulo. v. 5, n. 1, p. 94 - 99. 2002.

MELO, A. A. **Intoxicação experimental em equinos com sementes de *Crotalaria spectabilis***. 2010. 65p. Programa de aprimoramento profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV UNESP – Jaboticabal, 2010. (dados não publicados)

MEYER, D. J. The Liver: Part I. Bioquematical tests for the evolution of the hepatobiliary system. In: **Veterinary Learning Systems**. Veterinary laboratory medicine: in practice. Trenton, 1993. p. 154-162.

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

NAKAGE, A. P. M.; MACARI, M; NAKAGHI, L. S. O.; MALHEIROS, E. B.; VASQUES, L. H.; SECATO, E.R. Hematological and hormonal studies from broiler chickens fed with corn contaminants: *Crotalaria spectabilis* e *Senna occidentalis*. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.37, n. 5, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Washington, D.C.). **Nutrient requirements of dog and cats**. Washington: National Academy Press, 2006. 398p.

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.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2° ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1084p.

NEVES, M. C. P. *Crotalaria*. **Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - Embrapa Agrobiologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Seropédica, Rio de Janeiro. Disponível em: www.cnpab.embrapa.br/publicações, acesso em 03/06/2009, 17:30.

PEREIRA, W. A. B. **Alterações clínico-patológicas de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) intoxicados experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. *Papilionoidea*)**. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV-UNESP Jaboticabal, 2006.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M.; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 1, p.35-40, 2004.

REINDEL, J. F.; HOORN, J. G.; ROTH, R. A. Comparison of response of bovine and porcine pulmonary arterial endothelial cells to monocrotalina pyrrole. **Amer. J. Physiol.**, v. 261, n. 5, p. 206-214, 1991.

ROCHA, L. G.; ARAGÃO C. F. S.; LOIOLA, M. I. B.; PAIVA, N. R. F.; HOLANDA, C. M. C. X.; BRITO, M. E. F. Evaluation of the leishmanicid action of ethanol extracts of *C. retrusa* L. (*Fabaceae*). **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, v.1, p. 51-56, 2009.

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

SAS INSTITUTE (Statistical Analysis System): user guide manual: STAT, version 6.11. Cary, 1996.

SCHAFFRATH, V. R. **Consórcio de mandioca com *crotalaria* - efeitos sobre plantas espontâneas**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

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

SANTOS, P.B.; BARBOSA, J.P.; PINTO, A. C.; SOUZA, A. E.; GATASS, C.R. *Crotalaria retrusa* – atividade farmacológica de monocrotalina e de seu derivado N-óxido. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30., 2002, Poços de Caldas. **Resumo da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. p.122.

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**, v. 51, p. 187-191, 1996.

SEAWRIGHT, A. A.; KELLY, W. R.; HRDLIKA, J. Pirrolizidine alkaloids in cattle due *Senecio* species in Australia. **Vet. Rec.**, v.31, p. 188-189, 1991.

SIMPSON, C. F.; WALDROUP, P. W.; HARMS, R. H. Pathologic changes associated with feeding various levels of *Crotalaria spectabilis* seed to poultry. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.142, n.3, p. 264-271, 1963.

SMITH, F. H., OSBORNE, J. C. Toxic Effects of *Crotalaria* Seed. **Veterinary Medicine**, v. 57, p.234-237, 1962.

SMITH, H. A., JONES, T. L., HUNT, R. D. **Veterinary Pathology**. 4 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1972. p.910-914.

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.

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.

SPERL, W.; STUPPNER, H.; GASSNER, I.; JUDMAIER, W.; DIETZE, E. H.; VOGEL, W. Reversible hepatic veno-occlusive disease in na infant after consumption of pirrolizidine containing herbal tea. **Europe Journal Pediatric**, v. 154, p. 112-116, 1995.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. 1º ed. Barueri: Manole, 2008. 942p.

STEYN, D. G. **The toxicology of plants in South Africa**. Central News Agency, p.243-254, 1974.

SUBRAMANIAN, K. S.; MERANGER, J. C. Simultaneous determination of 20 elements in some human kidney and liver autopsy samples by inductively coupled plasma emission spectrometry. **Sci. Total Environ**. v. 24. n. 147, 1982. p. 10-11.

SWICK, R. A. Hepatic metabolism and bioactivation on micotoxins and plants toxicans. **Journal American of Science**, v.58, p.1016-27, 1984.

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**, 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. 327-352.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. S.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Shalm`s veterinary hematology**. 5º ed. Baltimore: Lippincott Williams& Wilkins, 2000. p. 891-98.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Veterinária**.1ºed., São Paulo: Roca, 2007. 582p.

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

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. 95p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. In: **Plantas tóxicas do Brasil**, 2 ed., Helianthus: Rio de Janeiro, p. 240 – 242, 2000.

TORRES, M. B. A.; SALLES, M. W. S.; HEADLEY, S. A.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por sementes de *crotalaria spectabilis* (Leguminosaea) em suínos. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 307-312, 1997.

TORRES, M. B. A. M.; COELHO, K. I. R. Experimental poisoning by *Senecio brasiliensis* in calves: quantitative and semi-quantitative study on changes in the hepatic extracellular matrix and sinusoidal cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 28, v. 1, p. 43-50, 2008.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3 ed. Wallingford: Cabi Publishing, 2001. 614 p.

VENDECOURT, B., TRUMP, E.C. **Comon poisonous plants of East Africa**. London: Collins, 1969. p.80-86.

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**, v. 155, p. 411-420, 2005.

WEBB, L.V. **Guide to the medical and poisonous plants of Queensland**. Melborne, Council: of Scientific and Industrial Research, 1948. p. 81-3 (Bulletin, 232).

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

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

YEE, S. B.; HANUMEGOWDA, U. M.; HOTCHKISS, J. A.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Role neutrophils in the synergistic liver injury from monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide exposure. **Toxicological Sciences**, v. 75, p. 43-56, 2003.

ANEXO

Anexo 1. Valores de referência para exames hematológicos e bioquímicos, de acordo com Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”. Jaboticabal – 2010.

ESPÉCIE	VALORES DE REFERÊNCIA													
	PARÂMETROS ERITROLEUCOMETRÍCOS E PLAQUETÁRIOS													PLAQUETAS. x10 ³ /µL
	HE X10 ⁹ /µL	LE x10 ³ /µL	HB g/dL	HT %	BAS.	EOS.	BAST.	SEG.	BAST.	SEG.	LINF.	MON.	MON.	
CANINA	5,5 - 8,5	6 - 18	12 - 18	37 - 55	00 - 01	2 - 10	0 - 3	60 - 77	13 - 30	3 - 10	180 - 400			
FELINA	5,5 - 10	8 - 25	8 - 14	24 - 45	0 - 1	2 - 12	0 - 3	35 - 75	20 - 55	1 - 4	200 - 600			
BOVINA	5,0 - 10	4 - 12	8 - 14	24 - 48	0 - 2	2 - 20	0 - 2	15 - 45	45 - 75	2 - 7	200 - 600			
EQUINA	7,0 - 13	7 - 14	10 - 18	32 - 55	0 - 3	0,5 - 11	0 - 2	30 - 65	25 - 70	1 - 7	200 - 600			
OVINA	8,0 - 16	4 - 12	8 - 16	24 - 50	0 - 3	1 - 10	0 - 2	10 - 50	40 - 75	1 - 6	200 - 700			
CAPRINA	12 - 20	6 - 16	8 - 14	24 - 48	0 - 2	3 - 8	0 - 2	30 - 48	50 - 70	1 - 4	200 - 800			
SUINA	5,0 - 8,0	11 - 12	10 - 16	32 - 50	0 - 2	0,5 - 11	0 - 4	28 - 47	39 - 62	2 - 10	200 - 800			
VGM fL	HGM pg	CHGM g/dL	RETIC. %	BAS.	EOS.	SEG.	BAST.	SEG.	BAST.	LINF.	MON.	FORMULA LEUCOCITÁRIA ABSOLUTA (X10 ⁹ /µL)		
CANINA	60 - 77	19 - 23	31 - 34	0,1 - 1,5	0 - 0	0,12 - 1,8	3,6 - 13,8	0 - 0,5	0,72 - 5,4	0,18 - 1,8				
FELINA	39 - 55	13 - 17	31 - 35	0,1 - 1,8	0 - 0	0,16 - 3,0	2,8 - 17,5	0 - 0,7	1,6 - 13,7	0,08 - 1,0				
BOVINA	40 - 60	14 - 18	26 - 34	-	0 - 0,2	0,08 - 2,4	0,6 - 5,4	0 - 0,2	1,8 - 9,0	0,08 - 0,8				
EQUINA	37 - 52	15 - 19	31 - 35	-	0 - 0,3	0,03 - 1,5	2,1 - 9,0	0 - 0,2	1,75 - 9,8	0,03 - 0,9				
OVINA	23 - 48	09 - 13	29 - 35	-	0 - 0,3	0,04 - 1,2	0,4 - 6,0	0 - 0,2	1,6 - 9,0	0,04 - 0,7				
CAPRINA	10 - 37	05 - 08	30 - 35	-	0 - 0,3	0,18 - 1,3	1,8 - 7,6	0 - 0,3	3,0 - 11,2	0,06 - 0,6				
SUINA	50 - 68	16 - 22	30 - 34	0,1 - 1,6	0 - 0,4	0,05 - 2,4	3,0 - 10,3	0 - 0,8	4,3 - 13,6	0,22 - 2,2				
PARAMETROS BIOQUÍMICOS														
UREIA mg/dL	CREA mg/dL	SÓDIO mmol/L	POTÁS. mmol/L	PT g/dL	ALB. g/dL	COLEST. mg/dL	FIBR. mg/dL	BIL. D. mg/dL	BIL. T. mg/dL	AST U/L	LIPASE U/L			
CANINA	15 - 65	0,5 - 1,5	146 - 156	3,8 - 5,1	5,8 - 7,9	2,6 - 4,0	125 - 270	0,06 - 0,12	0,1 - 0,5	10 - 88	27 - 750			
FELINA	32 - 75	0,8 - 2,0	151 - 161	3,5 - 5,1	6,1 - 8,8	2,6 - 4,3	90 - 205	0,05 - 0,50	0,1 - 0,5	10 - 88	25 - 750			
BOVINA	12 - 65	0,8 - 1,4	138 - 148	3,8 - 5,1	6,3 - 8,9	2,8 - 3,8	80 - 180	0,04 - 0,40	0,0 - 0,50	78 - 132	-			
EQUINA	21 - 54	0,9 - 1,8	136 - 143	2,6 - 4,9	5,6 - 8,0	3,0 - 4,0	75 - 150	0,0 - 0,40	1,0 - 2,0	226 - 366	-			
OVINA	17 - 43	1,0 - 2,7	139 - 152	3,9 - 5,4	6,0 - 7,9	2,4 - 3,0	50 - 140	0,0 - 0,27	0,1 - 0,5	98 - 278	-			
CAPRINA	21 - 60	0,9 - 1,8	135 - 154	4,6 - 9,8	6,4 - 7,8	2,0 - 4,4	50 - 140	0,0 - 0,27	0,0 - 0,1	98 - 278	-			
SUINA	17 - 65	1,0 - 3,0	135 - 150	7,8 - 10,6	7,4 - 8,9	2,0 - 3,9	36 - 154	0,0 - 0,30	0,0 - 0,1	9 - 113	-			
GGT U/L	CÁLCIO mg/dL	FOSF. mg/dL	MAG. mg/dL	ALT U/L	GLIC. mg/dL	CK U/L	LDH U/L	F.ALC. U/L	AMIL. U/L	TRIGL. mg/dL	CLORO mEq/L			
CANINA	1 - 10	8,6 - 11,2	2,2 - 5,5	1,8 - 2,4	10 - 88	60 - 110	20 - 200	20 - 150	300 - 2000	27 - 115	105 - 115			
FELINA	1 - 10	8,0 - 10,7	1,8 - 6,4	1,5 - 2,5	10 - 88	70 - 150	50 - 450	10 - 80	500 - 1800	20 - 150	117 - 123			
BOVINA	11 - 24	9,7 - 12,4	5,6 - 6,5	1,8 - 2,3	14 - 38	45 - 75	66 - 120	90 - 170	126 - 250	-	97 - 111			
EQUINA	4 - 13	11,0 - 13,6	3,1 - 5,6	2,2 - 2,8	34 - 113	75 - 115	86 - 140	143 - 395	35 - 100	-	99 - 109			
OVINA	-	10,0 - 13,0	5,0 - 7,3	2,2 - 2,8	60 - 84	50 - 80	-	68 - 387	-	35 - 100	98 - 115			
CAPRINA	-	10,0 - 13,0	5,5 - 6,5	2,8 - 3,6	60 - 84	50 - 80	-	68 - 387	-	35 - 100	98 - 115			
SUINA	-	8,0 - 12,0	5,3 - 9,6	2,7 - 3,7	32 - 84	65 - 95	-	26 - 362	-	35 - 100	98 - 115			