

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

**ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM CÃES INTOXICADOS
EXPERIMENTALMENTE POR SEMENTES DE *Crotalaria
spectabilis***

Carolina Bellodi

Médica Veterinária

2014

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

**ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM CÃES INTOXICADOS
EXPERIMENTALMENTE POR SEMENTES DE *Crotalaria
spectabilis***

Carolina Bellodi

Orientadora: Prof. Dra. Rosemeri Oliveira Vasconcelos

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

2014

Bellodi, Carolina
B446a Alterações hepáticas em cães intoxicados experimentalmente por
sementes de *Crotalaria spectabilis* / Carolina Bellodi. – – Jaboticabal,
2014
xvi, 45 p.: il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Banca examinadora: Mário Roberto Hatayde, Adriana Coelho de
Souza, Pamela Rodrigues Reina Moreira, Daniel Cortes Beretta.
Bibliografia

1. Alcalóides pirrolizidínicos 2. Cães. 3. Células estreladas
hepáticas. 4. Fibrose hepática. 5. Intoxicação por planta. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM CÃES INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE POR SEMENTES DE *Crotalaria spectabilis*

AUTORA: CAROLINA BELLODI

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MARIO ROBERTO HATAYDE

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ADRIANA COELHO DE SOUZA
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP

Profa. Dra. PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA
Pós-Doutoranda do Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. DANIEL CORTES BERETTA
Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade de Rio Verde / Rio Verde/GO

Data da realização: 30 de maio de 2014.

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 julho de 2010, obteve o título de mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica) pela Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde com ênfase em Clínica das intoxicações. Em agosto de 2010 foi selecionada para iniciar seu doutoramento, pela mesma universidade, sob orientação do Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde, que após sua aposentadoria transferiu a orientação para a Prof. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens, e falasse a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria.”

[1 Coríntios13]

A Deus, pela caminho maravilhoso que me proporcionou;

Aos meus queridos avós, Aldo Bellodi e 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, que sempre acreditaram no meu potencial, muito obrigada pela credibilidade, amor, carinho, compreensão e amizade;

Ao meu noivo Oswaldo Martins Prudente Corrêa, pela paciência e amor que nos mantém unidos;

Por fim, todas as “pessoas” que acreditaram e apostaram que eu poderia.

Dedico com muito amor e carinho.

A minha família, incansavelmente, pela credibilidade e principalmente 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” e ao Departamento de Patologia Veterinária, desta instituição, pelo apoio, dedicação e amizade nas horas mais difíceis;

Aos colegas de pós-graduação, meu ETERNO AGRADECIMENTO, pelos ótimos momentos que passamos e a ajuda interminável no laboratório;

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde, por acreditar no meu trabalho, pela amizade, lição de vida, ensinamentos e principalmente por descobrir uma pessoa tão especial e generosa, o meu sincero respeito e agradecimento;

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

A querida Prof^a. Dr^a. Rosemeri Oliveira Vasconcelos pela orientação, confiança, amizade, paciência e principalmente seus sábios conhecimentos, meu sincero agradecimento e admiração.

A magnífica colaboração da banca examinadora 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
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Intoxicação por <i>Crotalaria spectabilis</i>	3
2.2 Características dos princípios tóxicos da <i>C. spectabilis</i> nas diferentes espécies animais.....	5
2.3. Toxicidade causada pela <i>Crotalaria spectabilis</i> e as alterações hepáticas.....	7
2.4 Considerações sobre células estreladas do fígado.....	9
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo Geral.....	14
3.2. Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Grupos Experimentais e Modelo de Indução da Intoxicação.....	15
4.2 Parcelas experimentais.....	16
4.3 Obtenção do material biopsiado.....	16
4.4 Análise Histopatológica.....	18
4.5 Análise Imuno-histoquímica.....	19
4.6 Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Análise Histopatológica.....	21
5.2 Análise imuno-histoquímica.....	27

6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL




CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 0016735-08 do trabalho de pesquisa intitulado “**Intoxicação experimental de cães com sementes de *Crotalaria Spectabilis* (Leg. Papilionoideae)**”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 14 de agosto de 2008.

Jaboticabal, 15 de agosto de 2008.


Prof. Dr. Marcos Lânia de Araújo
Presidente - CEBEA

Alterações hepáticas em cães intoxicados experimentalmente por sementes de *Crotalaria spectabilis*

RESUMO – A intoxicação por plantas invasoras de pastagens causa enormes prejuízos na pecuária brasileira, pois geralmente ocorre o consumo espontâneo da planta em pastagens de qualidade ruim, devido a seca, geada ou queimadas. Os animais também podem intoxicar-se acidentalmente, pela contaminação de grãos utilizados na dieta de animais de grande porte com sementes destas plantas. Plantas do gênero *Crotalaria* sp. possuem um princípio ativo que induz cirrose hepática em animais e suas sementes comumente misturam-se a grãos durante a colheita mecanizada. Existem várias pesquisas relacionando a proliferação das células estreladas hepáticas com fibrose hepática no homem. Nenhum estudo foi feito com animais de companhia relacionando a qualidade da ração oferecida aos mesmos e seus efeitos deletérios. Portanto, avaliar a susceptibilidade do cão como modelo experimental para um quadro de intoxicação por sementes de *Crotalaria spectabilis*, bem como, verificar se ocorre fibrose hepática e proliferação de células estreladas hepáticas em fígados de cães que receberam diferentes concentrações de sementes da planta (G_1 - 0,2%, G_2 - 0,4% e G_3 - 0,6%), nos tempos zero (controle basal), T_{14} dias e T_{28} dias foram os objetivos deste estudo. As amostras de fígado foram colhidas por biopsia guiada por ultrassom, com os animais sob anestesia. A fibrose foi avaliada por métodos histoquímicos (Gordon e Sweet; Tricrômio de Masson e Picrosirius) e a densidade de células estreladas hepáticas foi avaliada por imuno-histoquímica. Os fígados de animais dos grupos G_1 e G_2 não apresentaram aumento de fibras reticulares ou de fibras colágenas em T_{14} e T_{28} . No grupo G_3 verificou-se discreta fibrose, predominantemente em T_{28} . Conclui-se que na intoxicação experimental de cães por sementes de *Crotalaria spectabilis* ocorre uma proliferação de células estreladas hepáticas na fase inicial, seguida por fibrose e redução desta população celular, confirmando o papel destas células na reparação do tecido hepático.

Palavras-chave: alcalóides pirrolizidínicos, cão, células estreladas hepáticas, fibrose hepática, intoxicação por planta

Hepatic changes in dogs experimentally intoxicated by *Crotalaria spectabilis* seeds

ABSTRACT- The poisoning of pasture weeds cause huge losses in Brazilian cattle, usually occurs because the spontaneous ingestion of the plant in pastures of poor quality due to drought, frost or fire. Animals can also become contaminated accidentally by contamination of grain used in the diet of large animals. Plants of the genus *Crotalaria* sp. have an active ingredient that induces liver cirrhosis in animals and their seeds commonly blend the grains during mechanical harvesting. No study has been done with pets relating the quality of feed offered to them. The susceptibility of experimental dog model as a framework to poisoning *Crotalaria spectabilis* seeds, as well as to verify whether proliferation of hepatic fibrosis and hepatic stellate cells in the liver of dogs receiving different concentrations of plant seeds (G_1 - 0, 2 % , G_2 - 0.4 % and G_3 - 0.6 %) , in zero time (baseline control) , T_{14} days and T_{28} days were the goals of these studies . The liver samples were obtained by biopsy guided by ultrasound, with the animals under anesthesia. Fibrosis was evaluated by histochemical methods (Gordon and Sweet, Masson Trichrome and Picrosirius) and the density of hepatic stellate cells was evaluated by immunohistochemistry. The livers of animals in groups G_1 and G_2 showed no increase in reticulin or collagen fibers in T_{14} and T_{28} . In G_3 showed mild fibrosis, predominantly in T_{28} . We conclude that the experimental poisoning of dogs by *Crotalaria spectabilis* seeds a proliferation of hepatic stellate cells in the initial phase occurs, followed by fibrosis and reduction in this cell population, confirming the role of these cells in repair of liver tissue.

Keywords : pyrrolizidine alkaloids, dog, hepatic stellate cells, liver fibrosis, plant poisoning

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e erro padrão médio (\pm EPM) de células estreladas hepáticas de cães intoxicados experimentalmente com diferentes dosagens de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> ($G_1=0,2\%$, $G_2= 0,4\%$ e $G_3= 0,6\%$), a intervalos de 14 dias, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2014.....	26
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Crotalaria spectabilis*: (A) - detalhes da planta mostrando folhas, racemos terminais com inflorescências amarelas e as vagens onde localizam-se as sementes; (B) *Crotalaria spectabilis* (C) – sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fonte: Arquivo pessoal)..... 4
- Figura 2.** Morfologia das células hepáticas estreladas em fígado normal. A. Diagrama da arquitetura do sinusóide hepático demonstrando a disposição das células estreladas em azul (setas). B. Maior resolução das células estrelas situadas no espaço subendotelial (FRIEDMAN, 2008)..... 12
- Figura 3.** (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)..... 14
- Figura 4.** Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (grupo 1 / 0,2% de sementes). (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Tricrômio de Masson / Obj. 20x). (B-D) Notar que não existe diferença na proporção das fibras reticulares nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} . (escore 0) Coloração de Gordon & Sweet. Obj. 40x..... 22
- Figura 5.** – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (grupo 2 / 0,4% de sementes). (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Tricrômio de Masson / Obj. 20x). (B-D) Notar que não existe diferença na proporção das fibras reticulares nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} . (escore 0) Gordon e Sweet. Obj. 40x..... 23
- Figura 6.** – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (grupo 3 / 0,6% de sementes). (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Tricrômio de Masson / Obj. 20x). (B e C) Notar que não existe diferença na proporção das fibras reticulares nos tempos T_0 , T_{14} (escore 0) mas em T_{28} verifica-se um discreto aumento de fibras reticulares (escore 1) Coloração de Gordon & Sweet. Obj. 40x..... 24
- Figura 7.** – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis*. (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Hematoxilina e Eosina). (B-F) Notar que existe um discreto aumento na proporção das fibras colágenas (setas) no tempo T_{28} . Coloração de Picrossirius. Obj. 40x..... 25

- Figura 8.** – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (grupo 1 / 0,2% de sementes). (A-C) Notar a imunomarcção na membrana das células estreladas hepáticas (setas) nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} respectivamente. Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Obj. 40x..... **27**
- Figura 9.** – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (grupo 2 / 0,4% de sementes). (A-C) Notar a imunomarcção na membrana das células estreladas hepáticas (setas) nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} respectivamente. Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Obj. 40x..... **28**
- Figura 10.** – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (grupo 3 / 0,6% de sementes). (A-C) Notar a imunomarcção na membrana das células estreladas hepáticas (setas) nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} respectivamente. Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Obj. 40x..... **29**
- Figura 11.** Valores médios de células estreladas hepáticas de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T_0 , T_{14} e T_{28}), nos grupos (G_1 , G_2)..... **30**

1. INTRODUÇÃO

As intoxicações por plantas tóxicas são frequentemente relatadas na literatura em várias espécies de animais de produção. Estes podem consumi-las pela escassez de alimento ou pela contaminação de grãos utilizados na alimentação animal, no momento da colheita.

O crescimento exponencial do mercado de rações para animais de companhia leva a maior preocupação sobre o controle de qualidade da matéria-prima utilizada na formulação destas rações. Em muitas situações, impurezas poderiam contaminar a ração e muitas destas podem causar quadros de intoxicação ou outros efeitos deletérios sobre a qualidade nutricional ou sobre a imunocompetência destes animais. Essas impurezas podem ser de natureza variada, dentre elas, as plantas tóxicas e suas sementes. Os fatores predisponentes para esta contaminação são a falta de tratamento do solo onde serão plantados os cereais, visando a eliminação de plantas invasoras, bem como, o tamanho do crivo da peneira utilizada pelas indústrias no recebimento desses grãos.

O principal foco das pesquisas com plantas tóxicas no Brasil está em grandes animais, pois a maioria delas é contaminante de pastagens e o seu consumo é favorecido em situações de escassez de alimentos, após geadas ou queimadas. Em todo o território brasileiro existe uma grande biodiversidade de plantas invasoras de áreas utilizadas para a pecuária. Os quadros clínicos e a taxa de mortalidade ocasionada pelos princípios ativos dessas plantas é variável, no entanto, em todas as situações causam prejuízos econômicos aos criadores. Para animais de companhia existem escassos relatos relacionados à ingestão acidental de plantas ornamentais e nenhuma atenção foi dada em a relação a qualidade da ração ingerida e a saúde de cães e gatos.

Uma das principais plantas tóxicas que são encontradas junto à ração dos animais de produção é a *Crotalaria sp.*, amplamente utilizada na agricultura com o objetivo de adubação verde. Seu princípio ativo é o alcalóide pirrolizidínico, detectado inclusive nas sementes da planta. As sementes são comumente encontradas junto aos grãos de soja e milho. Uma vez incorporada a terra, *Crotalaria sp.* 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 junto ao milho ou soja, que são vendidos às empresas produtoras de alimentos para animais. Já na fábrica, as pequenas sementes de *C. spectabilis* passam pelas peneiras, contaminando a ração e com isso causando uma série danos aos animais.

O principal órgão alvo das intoxicações por *C. spectabilis* é o fígado e a lesão causada pode evoluir para fibrose severa, insuficiência hepática e morte, em casos avançados. Na maioria das vezes, o diagnóstico de intoxicação por plantas tóxicas não é feito, pois seus sinais clínicos são inespecíficos e de evolução crônica e, podem ser confundidos com outros processos patológicos, dificultando estudos com esse enfoque.

Na literatura humana destaca-se o importante papel das células estreladas hepáticas na indução da fibrose hepática, pois as mesmas em situação de injúria são ativadas e são responsáveis pelo aumento da matriz extracelular (MEC). Em repouso elas possuem um fenótipo diferenciado e são responsáveis pela estocagem da vitamina A no microambiente hepático, mas quando ativadas em situações de injúria a hepatócitos, as mesmas adquirem um fenótipo sintético e induzem a deposição de colágeno no interstício hepático.

Considerando os escassos estudos com intoxicação por plantas em pequenos animais e dando continuidade a estudos anteriores do grupo de pesquisa, que comprovaram que o cão pode desenvolver um quadro similar aos animais de produção intoxicados por *C. spectabilis*, testou-se a relação das células estreladas hepáticas com a fibrose no fígado canino, em diferentes concentrações (0,2, 0,4 e 0,6%) e em diferentes tempos de evolução (zero, 14 e 28 dias).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Intoxicação por *Crotalaria spectabilis*

No Brasil, já foram registradas mais de 40 espécies de *Crotalaria* sp., todas causando perdas econômicas ocasionadas pela intoxicação acidental em animais (TOKARNIA et al. 2000). *C.spectabilis* é reconhecida como a espécie mais tóxica deste gênero (CLARKE e CLARKE, 1967). Em estudo conduzido no Norte da Austrália, com bovinos, mostrou que animais criados extensivamente estavam morrendo em áreas onde foi identificada a presença de diferentes espécies de *Crotalaria* sp., resultando em perdas econômicas (FLETCHER et al. 2009). Já foram apresentados relatos de intoxicação espontânea e experimental em várias espécies como suínos (REINDEL et al., 1991, SOUZA et al. 1997; TORRES et al. 1997; HATAYDE et al. 1998; SOUZA et al. 1998; UBIALI et al. 2011), bovinos (REINDEL et al., 1991; SEAWRIGHT et al. 1991; BOGHOSSIAN, et al. 2007; TORRES e COELHO 2008; FLETCHER et al. 2009), ratos (KAY et al. 1966; KAY et al. 1967; CARTENS e ALLEN, 1970; MEYRICK, 1979; CHEEKE, 1988; YAN et al 1995; MEDEIROS et al. 1999; FU et al. 2002; COPPLE et al. 2003), ovinos (CHEEKE, 1988; SÁNCHEZ, 2011) equinos (CHEEKE, 1988; MELO, 2012), coelhos (CHEEKE, 1988),perus (ALLEN, 1963; BURGUERA et al. 1983), frangos (SIMPSON et al.1963; FIGUEREDO et al. 1987; ALFONSO et al. 1993; HATAYDE et al. 1997a; HATAYDE et al. 1997b), galinhas poedeiras (PEREIRA,2006), caprinos (MEDEIROS et al. 1999) e cães (BELLODI et al. 2013) e também em 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).

Plantas do gênero *Crotalaria* são conhecidas popularmente como “xique-xique”, “guizo ou chocalho de cascavel”, pois seus frutos, quando secos, reproduzem som parecido ao serem tocados pelo vento. A planta recebeu o nome *Crotalaria*, pois o termo em latim significa chocalho. Pertencem à família Leguminosaea e a subfamília Papilionoideae (WILLIAMS e MOLYNEUX, 1987). É uma planta anual, ereta, ramificada, glabra, podendo chegar de 70 a100 cm de altura, com reprodução por sementes. Suas folhas são simples, glabras na face superior, medindo de 6 a12 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 μ g, em média (Figura 1) (LORENZI, 1991).

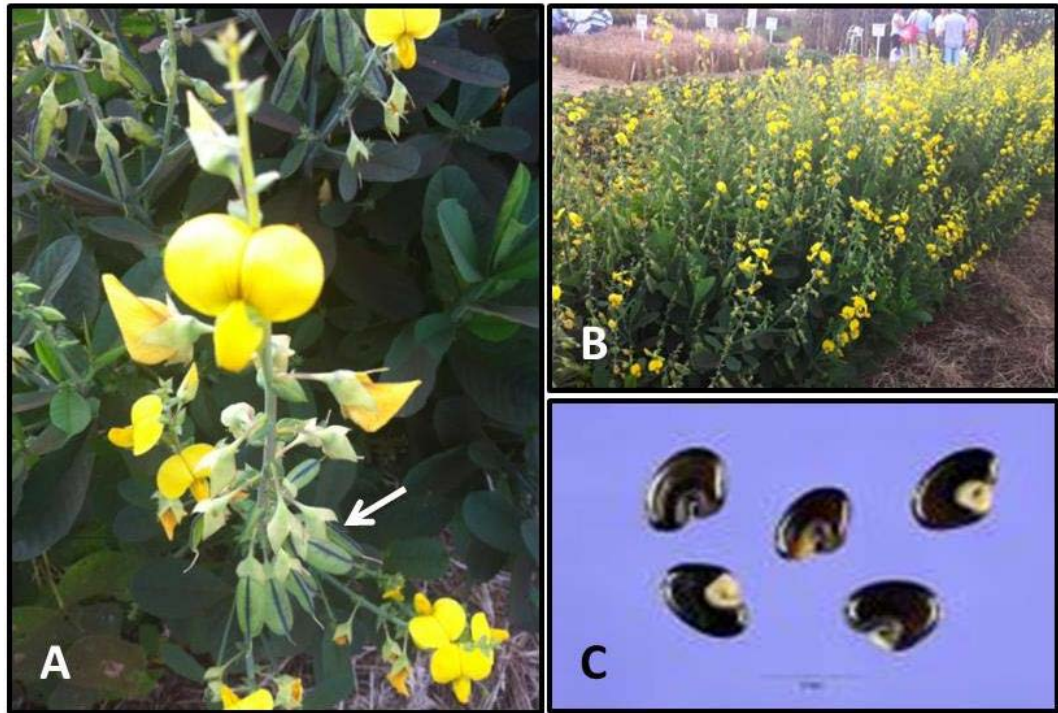


Figura 2. *Crotalaria spectabilis*: (A) Detalhes da planta mostrando folhas, racemos terminais com inflorescências amarelas e as vagens (seta branca), onde localizam-se as sementes. (B) Canteiro com vários exemplares de *Crotalaria spectabilis*. (C) Detalhes das sementes de *Crotalaria spectabilis*.

Por possuir alto poder de fixação de nitrogênio, a leguminosa *Crotalaria* sp. é utilizada como adubação verde, na recuperação de solos pobres por um custo mais baixo (JOLY, 1977; LORENZI, 1991) e também para controlar nematoides, sozinha ou associada à plantação. Isso se dá pelo efeito nocivo da monocrotalina, seu princípio ativo tóxico sobre os nematoides (GARRIDO et al., 2008).

A grande quantidade de húmus e nitrogênio adicionados ao solo pela *Crotalaria* sp. aumenta a produção de milho e soja. Nos casos de crescimento espontâneo, de *Crotalaria* nas plantações, suas sementes são colhidas juntamente com o milho e soja, realizadas por colheita mecanizada, podendo contaminar a ração, em fábricas com pouco ou nenhum controle de qualidade. Sendo assim, quando esses produtos contaminados são ingeridos, produzem efeitos deletérios nos animais (SMITH e OSBORNE, 1962). O controle é difícil, pois as sementes podem permanecer no solo por quatro anos ou mais, antes de germinarem e a mesma rebrota facilmente (EMMEL, 1943).

Segundo a portaria n° 845 de 8 de novembro de 1976, 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, com dimensões de 4x3x2mm, irão contaminar à ração dos animais.

2.2 Características dos princípios tóxicos da *C. spectabilis* nas diferentes espécies animais.

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. FU et al. (2002), também observaram que 3% dessas plantas que floresciam no mundo pertenciam a grande família dos APs considerados tóxicos.

O AP encontrado em maior quantidade na *C. spectabilis* é a monocrotalina, presente em diversas partes da planta, sendo a semente a porção mais tóxica (PIERCY e RUSOFF, 1946; WILLIAMS e MOLYNEUX, 1987; SANTOS et al. 2008). BULL et al. (1968) e FLETCHER et al. (2009) estudaram os possíveis APs encontrados nessas espécies de plantas tóxicas e descobriram a presença de outro tipo de alcaloide, a espectabilina, presente em quantidade mínima e não significativa se comparada a monocrotalina.

Alcaloides 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 que 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). Para exercerem sua toxicidade, de caráter agudo ou crônico, 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).

As principais rotas da monocrotalina (APs) no metabolismo hepático são a hidrólise pelo grupo funcional éster para formação da base retronecina e ácido monocrotálico; N-oxidação da base retronecina, formando a monocrotalina N-óxido e a desidrogenação formando derivados de dehidrocrotalina ou monocrotalina pirrol, ou seja, os pirróis tóxicos (BAILEY, 1978; FU et al. 2002; WANG et al. 2005; SANTOS et al. 2008).

Na literatura são relatadas diferenças entre espécies animais em relação à susceptibilidade à intoxicação pelos APs (HOOPER, 1978). As diferenças 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 toxicose dos alcalóides em virtude que aminoácidos que constituem a glutathione, exercem importante papel na rota de detoxificação dos APs (CHEEKE, 2009).

Bovinos e equinos são 30 a 40 vezes mais susceptíveis a intoxicação por APs, que ovinos e caprinos. A diferença parece estar relacionada com a maior capacidade dos ovinos em metabolizar os APs no fígado. Fato este que pode estar relacionado à dieta consumida antes da domesticação, por esses animais serem menos seletivos, desenvolveram resistência a toxinas, durante a seleção pelo homem. Atribuí-se também a resistência dos ovinos a uma maior quantidade de microorganismos no rúmen, capazes de biotransformar esses princípios tóxicos e inativá-los com maior eficiência que os bovinos (CHEEKE, 1994; RADOSTITS et al. 2002).

As diferentes respostas ou a resistência individual dos animais aos APs podem se basear em detoxificação bacteriana no trato gastrointestinal, taxa de metabolização 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 pode haver diferença de susceptibilidade entre as raças e genética de linhagens, principalmente em ovinos (CHEEKE, 1994; SANTOS et al. 2008).

2.3. Toxicidade causada pela *Crotalaria spectabilis* e as alterações hepáticas

Dentre as inúmeras funções desempenhadas pelo fígado uma delas é a de neutralização de substâncias tóxicas. O fígado processa uma série de reações enzimáticas que alteram a atividade e as propriedades físicas de vários compostos endógenos e exógenos, processo conhecido como biotransformação. Substratos submetidos a essa biotransformação são geralmente compostos hidrofóbicos e necessitam ser convertidos em compostos hidrossolúveis para serem eliminados do organismo pela bile ou pela urina (BARROS, 2011).

Os pirróis causam danos irreversíveis ao fígado e lesam as células hepáticas por inibição da mitose. Essa agressão ao fígado pode afetar hepatócitos, as células de Kupffer, células Ito ou células estreladas hepáticas, células endoteliais, células de

ductos biliares e linfócitos associados ao fígado, bem como, a matriz extracelular hepática (MEC). Essas alterações podem ser de padrão reversível ou irreversível, dependendo do grau da lesão causada no parênquima (TORRES e COELHO, 2008). Os pirróis lesam os hepatócitos por inibição da mitose, causando megalocitose, necrose e redução do número de hepatócitos, que são substituídos por tecido fibroso, resultando em disfunção hepática grave e morte (SEAWRIGHT et al. 1991).

A desidrogenação da monocrotalina é marcada pela formação do pirrol de monocrotalina (MCTP), composto solúvel em água e que, quando presente na circulação sanguínea muda para uma forma indireta e é excretado 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 é, na maioria das vezes, catalisada pelo sistema enzimático citocromo P450 no fígado (MATTOCKS, 1986; CHEEKE, 1998). Esses compostos são eletrofílicos e reagem com componentes teciduais nucleofílicos, como ácidos nucléicos e proteínas (SPERL et al. 1995). Parte dos pirróis produzidos no fígado são metabólitos reativos e suficientemente estáveis e irão para a circulação, por meio dos vasos portais, ligando-se aos tecidos e 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 conterem enzimas do sistema citocromo P450, responsáveis pela metabolização (SEAWRIGHT et al. 1991).

Quando estes compostos tóxicos endógenos lipossolúveis entram no fígado, via sistema porta hepático, ocorre biotransformação em compostos hidrossolúveis, para sua eliminação pela urina ou bile. Os hepatócitos do centro do lóbulo (zona 3) são mais sensíveis ao princípio tóxico em comparação aos hepatócitos da zona 1, porque possuem níveis altos de enzimas do sistema P-450, que atuam no processo de biotransformação. No centro do lóbulo hepático há baixa tensão de oxigênio e níveis reduzidos de glutathionaperoxidase, que é responsável pela diminuição do stress oxidativo (BARROS, 2011).

Os APs produzem necrose de hepatócitos centro-lobulares (zona 3), 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, por meio de fatores teciduais (COPPLE et al. 2003).

Outros danos também descritos foram edema, megalocitose, cariomegalia com cromatina condensada, fibrose, proliferação de ductos biliares, veno-oclusão e perda da função hepática (CHEEKE e SHULL, 1985; SCHULTZE et al. 1996; HANUMEGOWDA et al. 2003; WANG et al. 2005, BELLODI et al. 2013), bem como, degeneração gordurosa, 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), a intoxicação aguda em humanos, causa hepatotoxicidade massiva com quadros de necrose hemorrágica, enquanto o envenenamento crônico, ocasiona lesões em diversos órgãos, como fígado, pulmões, vasos sanguíneos, rins, pâncreas, trato gastrintestinal, medula óssea e cérebro.

2.4 Células estreladas hepáticas

Essas células foram descritas inicialmente por Kupffer em 1876, pela coloração de cloreto de ouro, para identificação de gotículas de vitamina A. Ele referiu – se a essas células como células estreladas. Após isso uma série de técnicas foram utilizadas subsequentemente para caracterizar as células estreladas. Bronfenmajer, Schaffner e Popper propuseram o nome de lipócito a essa célula para refletir seu papel na absorção da gordura (vitamina A) e também apontaram a semelhança das mesmas com fibroblastos. Wake estabeleceu que as “células perisinusoidais” foram às mesmas descritas por Kupffer, quase 100 anos atrás. Um importante papel funcional das células estreladas hepáticas é a reparação, pela proximidade delas com fibras de colágeno no fígado lesado. Elas foram

consideradas células precursoras de miofibroblastos. A associação entre as células estreladas hepáticas e a matriz extracelular provocou interesse em pesquisas e somente em 1996 o seu nome foi padronizado para células estreladas hepáticas e os sinônimos, tais como, células peri-sinusoidais, lipócitos, células armazenadoras de gordura, células Ito foram desconsiderados (FRIEDMAN, 2008; YIN et al., 2013).

O conhecimento sobre as características, a linhagem e função das células estreladas durante o desenvolvimento do fígado é essencial para a compreensão da ativação das células estreladas hepáticas e seu papel nas doenças hepáticas. Estudos recentes em modelos animais e sistemas de cultura de células têm fornecido informações importantes sobre o desenvolvimento deste tipo celular. A origem embrionária das células estreladas hepáticas não está bem elucidada, porque elas expressam genes marcadores de todas as três camadas germinativas. Com isso, as células estreladas hepáticas são logo transformadas no fígado após injúria, por transição epitélio-mesenquimal. Por fim, as células mesenquimais derivadas da medula óssea também podem contribuir de forma menos importante com a transição das células estreladas hepáticas quiescentes para ativadas (FRIEDMAN, 2008; YIN et al., 2013).

Elas correspondem cerca de 15% do número total de células no fígado e mantêm o estoque principal de vitamina A em grânulos lipídicos característicos. Estas células possuem prolongamentos citoplasmáticos contráteis em contato íntimo com os sinusóides e podem interferir com o fluxo de sangue intra-hepático, devido ao contato simultâneo com os sinusóides e hepatócitos. A regulação parácrina de várias funções hepáticas e a capacidade neurotransmissora local foi atribuída a estas células. As mesmas podem produzir uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e outras substâncias bioativas em resposta a agentes nocivos, desempenhando um papel crucial no mecanismo de resposta a injúria, regeneração e fibrose no tecido hepático. Eles também participam na manutenção da matriz extracelular (MEC) e do espaço de Disse (BRANDÃO et al. 2006).

Células estreladas hepáticas ativadas são a principal fonte de metaloproteinases de matriz e seus inibidores, que participam da remodelação da MEC, da mesma forma são capazes de sequestrar moléculas biologicamente ativas.

A regeneração hepática é um processo de várias etapas e a regeneração cessa quando o fígado atinge o volume necessário para as necessidades do organismo. O fator anti-proliferativo de hepatócitos mais bem conhecido é TGF- β (fator de transformação de crescimento), que pode ser produzido pelas células estreladas hepáticas. Nas fases terminais da regeneração do fígado, esta citocina está em níveis elevados e inibe a proliferação de hepatócitos e induz a apoptose (REEVES e FRIEDMAN, 2002; YIN et al., 2013).

Em um fígado saudável, as células estreladas hepáticas podem desempenhar várias funções, dentre elas captação, armazenamento e liberação de retinóides, síntese e secreção de várias proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos, secreção de fatores de crescimento e citocinas e regulação do diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes fatores reguladores como as prostaglandinas, tromboxanos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). No espaço de Disse (espaço perisinusoidal), a principal característica dessas células, é o armazenamento de vitamina A, por inclusões lipídicas ricas com essa vitamina (Figura 2) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; FRIEDMAN, 2008).

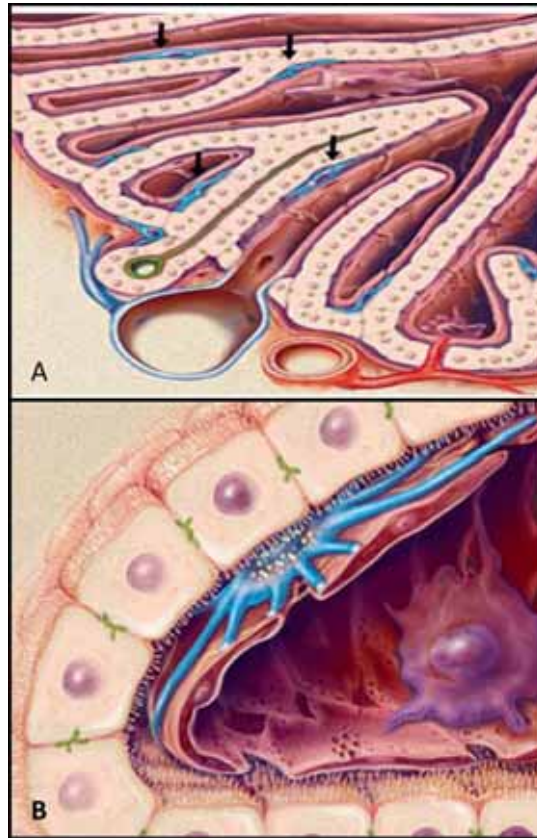


Figura 2. Morfologia e localização das células estreladas hepáticas. (A) Observa-se o diagrama da arquitetura do sinusoide hepático e a disposição das células estreladas hepáticas em azul (setas) no espaço de Disse. (B) Em maior resolução nota-se as células estrelas hepáticas em contato íntimo com hepatócitos e células endoteliais dos sinusóides. Os pontos esbranquiçados no citoplasma indicam o armazenamento de vitamina A no seu estado não ativado (FRIEDMAN, 2008).

As células estreladas hepáticas distribuem-se de forma extremamente dispersa e dificultando sua identificação em cortes histológicos convencionais. Os vacúolos lipídicos frequentemente são encontrados em cães e gatos. Nos processos de injúria, os estímulos para ativação dessas células ainda não estão definidos, mas em geral em fibrose do parênquima. Fator de crescimento derivado de plaquetas parece ser um importante mediador. Na doença crônica, a fibrose leva a alterações na estrutura das células endoteliais, que resulta em menor permeabilidade e bloqueio das trocas de nutrientes entre os hepatócitos e os sinusóides (KELLY, 1993).

Quando o fígado sofre injúria por infecção viral ou toxinas, as células estreladas hepáticas recebem sinais dos hepatócitos danificados e das células do sistema imune, diferenciando-se em miofibroblastos ativados. A proliferação da MEC irá gerar uma cicatriz temporária no local da lesão para proteger o fígado de danos adicionais. As células estreladas hepáticas secretam citocinas e fatores de crescimento que irão promover a regeneração das células epiteliais hepáticas. Na doença hepática crônica, prolongada e repetida ativação das células estreladas provoca fibrose do fígado caracterizada pela formação de cicatriz generalizada e desorganização da arquitetura e da função hepática. Evidências clínicas e experimentais recentes indicaram que a fibrose hepática é reversível após a remoção do agente etiológico subjacente e que durante a regressão da fibrose hepática, o número de células estreladas hepáticas ativadas é reduzida pela indução de senescência celular e apoptose ou pelo retorno ao estado de repouso. Por causa de seus papéis fundamentais de reparação do fígado e a patogênese da doença, as células estreladas hepáticas têm sido um dos principais focos de pesquisa neste órgão (YIN et al., 2013).

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade das células estreladas hepáticas no fígado de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, em diferentes tempos e concentrações e relacionar estes achados com a presença de fibrose hepática.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a existência de fibrose hepática em cães intoxicados experimentalmente por sementes de *Crotalaria spectabilis*, por meio de métodos histoquímicos;
- Avaliar e quantificar células estreladas hepáticas nos diferentes tempos de intoxicação, por meio da técnica de imuno-histoquímica;

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), e foi aprovado pela Comissão de Ética e bem estar animal, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Jaboticabal, em 14 de agosto de 2008 (protocolo nº. 0016735-08).

4.1 Grupos experimentais e modelo de indução da intoxicação

Doze cães adultos e sem raça definida foram utilizados no experimento, 6 machos e 6 fêmeas, com peso médio variando entre 8 a 10 Kg, oriundos do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV – UNESP), Campus de Jaboticabal. Os animais foram alojados individualmente em canis, equipados com comedouros e bebedouros individuais, no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP – Jaboticabal.

A alimentação era feita uma vez ao dia com a ração comercial PURUCA[®] carne e vegetais (composição nutricional em Anexo1) (BASA - Brasília Alimentos S/A), conforme as recomendações do National Research Council – NRC (2006), 350g / animal / dia, onde era adicionado a porcentagem de sementes, segundo o grupo ao longo do experimento. A água era fornecida à vontade.

Todos os animais foram vermifugados (ENDOGARD[®] 10-20 kg-VIRBAC, São Paulo, SP) e exames físicos e laboratoriais foram realizados antes do início do experimento, para aferição da sanidade.

Os doze animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, com machos e fêmeas (G₁, G₂ e G₃), totalizando quatro animais por grupo, que receberam diferentes concentrações de sementes de *C. spectabilis* na ração. O primeiro grupo (G₁) recebeu 0,2%, o segundo (G₂) 0,4% e o terceiro (G₃) 0,6% de sementes, calculados em relação aos 350 g de ração, por um período de 28 dias.

4.2 Parcelas experimentais

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 *pellets*. Os animais eram observados até o final da alimentação, para confirmação de que todos tinham ingerido a ração com as sementes.

Os comedouros, bebedouros e canis foram inspecionados diariamente para observar a ingestão de água, bem como a presença de vômito, diarreia, consistência das fezes, além de detectar perda de pelos dentro dos canis. Realizaram-se também exames clínicos e físicos dos animais e a pesagem semanal destes.

A obtenção das amostras de fígado dos cães que constituíram os grupos experimentais foi feita mediante biopsia hepática realizada no Hospital veterinário “Governador Laudo Natel” – UNESP, Jaboticabal, no período de janeiro a março de 2010, totalizando 36 amostras hepáticas. Foram feitas três biópsias em cada animal, com intervalos de 14 dias T_0 (controle), T_{14} e T_{28} .

4.3 Obtenção do material biopsiado

Para determinação dos parâmetros normais, as amostras biológicas de fígado foram colhidas no período pré-experimental, antes da inclusão das sementes à ração, determinando o tempo zero (T_0). Para o período experimental, os momentos de colheita foram os tempos 14 dias (T_{14}) e 28 dias (T_{28}), onde os grupos de animais já estavam recebendo diariamente diferentes porcentagens de sementes de *C. spectabilis*. Foi estabelecido o tempo zero (T_0), como controle, correspondentes aos índices basais de cada animal antes do início do fornecimento de sementes da planta.

As biópsias hepáticas foram realizadas em três momentos diferentes: T_0 , T_{14} e T_{28} do experimento, de onde foram colhidos 36 fragmentos de fígado.

A técnica utilizada foi a 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.

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^o e 13^o 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), 6mg/kg (droga que não apresenta efeitos hepáticos). 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 3A). 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 3B. Retirou-se a agulha lentamente do alvo e por meio de exame ultra-sonográfico 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 formol a 10% tamponado com fosfatos (pH 7,2), para ser processado conforme metodologia de rotina do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV – UNESP), para posterior análise em microscopia de luz e imuno-histoquímica.

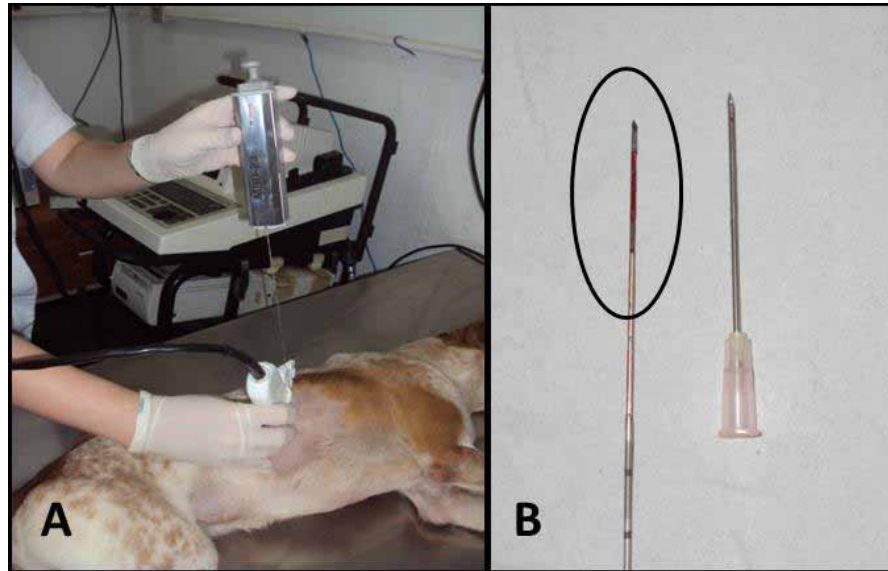


Figura 3. Procedimento de biópsia hepática. (A) Biópsia com agulha cortante tipo TRU-CUT[®]. Posicionamento da agulha no animal, com a colheita guiada por ultrassom. (B) Tamanho da amostra de tecido hepático (circulo) retirado do animal.

4.4 Análise Histopatológica

As amostras de fígado incluídas em parafina foram cortadas a 5 μ m e coradas com as colorações de Gordon e Sweet para análise da proporção de fibras reticulares. A coloração de Tricrômio de Masson foi utilizada para análise da presença de fibrose hepática. As técnicas seguidas respeitaram o protocolo de Luna (1992).

A coloração de Picrosirius (MONTES, 1996) foi utilizada para identificação do colágeno existente na região hepática dos animais intoxicados. Os cortes parafinados foram corados com Sirius red (Cód. 35780 – Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) dissolvido em solução saturada de ácido pícrico. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz (lâmpada de halogênio) com filtro de polarização no microscópio Nikon Eclipse E200.

O aumento da proporção de fibras reticulares e de fibras colágenas foi feita por escores: (0) normal; (1) discreta; (2) moderada e (3) acentuada; Onde o escore 3

indica um aumento da coloração histoquímica nas áreas de fibrose associado à distorção da arquitetura hepática, pela redução dos hepatócitos.

4.5 Análise Imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada em todos os fragmentos de fígado para detecção de células estreladas hepáticas, pelo uso do anticorpo monoclonal feito em camundongo que detecta miofibroblastos (α -SMA, marca DBS, cód MOB 001). Um resumo do protocolo está descrito abaixo:

Inicialmente foi realizada a desparafinização dos cortes em estufa a 60°C, durante uma hora e em xilol por 20 minutos. Em seguida fez-se banhos em uma bateria de álcool em concentrações decrescentes e hidratação em água destilada. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (30 volumes) e metanol utilizando uma solução a 10%, por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegido de luz. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com produto comercial (Protein Block, DAKO, cód. X0909), durante 20 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente, em seguida fez-se um segundo bloqueio com solução de leite em pó desnatado (Molico®) diluído em água destilada a 3%, por 40 minutos, diluídos em água destilada. O anticorpo primário foi utilizado na diluição de 1:600, por 18 horas em câmara úmida a 4°C, utilizando diluente de anticorpo (Dako, cód. 5302283-2). Após os cortes foram incubados com o Complexo de Polímeros ligados a Peroxidase (kit Advance HRP, DAKO, cód. K4068) e na revelação da reação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB, DAKO, cód. K3468), por três minutos. Entre todos os passos fez-se banhos com solução de TRIS HCL (pH 7,4), por 5 minutos. Na contra-coloração utilizou-se Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck). O controle negativo da reação foi feito pela exclusão do anticorpo primário da reação, que foi substituído pelo diluente de anticorpos. O controle positivo interno foi a musculatura lisa das paredes das artérias hepáticas.

Para a determinação do número de células imunomarcadas utilizou-se 5 campos microscópicos (Nikon Eclipse E200) por lâmina, com a objetiva de 40x, a qual apresenta uma área de aproximadamente 0,19625 mm². Estes campos foram

fotografados e a determinação da média do número de células imunomarcadas por animal foi feito pelo programa de análise de imagens Micrometrics™ SE Premium (Versão 2.8, 2009).

4.6 Análise estatística

A imunodeteção das células estreladas hepáticas foi submetida 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 três níveis (T_0 , T_{14} e T_{21}), com quatro animais em cada grupo. Os dados foram transformados em raiz quadrada da observação + 1.

A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, para fatores principais de interação, com um valor de interação de significância $P < 0,05$. Foram utilizados dois programas estatísticos: o SAS (Statistical Analysis System – SAS, 1996) e Teste R (2013).

5. RESULTADOS

5.1 Análise Histopatológica

Por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), foram encontradas alterações nos diferentes tempos de intoxicação, tais como, megalocitose, degeneração hidrópica moderada, presença de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) em região periportal, acúmulo de leucócitos nos sinusóides, cariomegalia, anisocitose, presença de pigmento biliar nos canalículos biliares. Foram evidenciados também focos de hemorragia (BELLODI et al., 2013).

Na coloração de Gordon e Sweet, verificou-se que a proporção de reticulina no tecido hepático teve os escores predominando em 0 nos grupos 1 e 2 e nos tempos T_0 , T_{14} e T_{28} (Figuras 4 B-D e 5 B-D). No grupo G_3 (0,6%) houve uma predominância do escore 1 em T_{28} (Figura 6D).

Na coloração de Tricrômio de Masson também foram observados os mesmos escores observados para reticulina, conforme pode ser observado nas Figuras 4A e 5A. Um discreto aumento na proporção de tecido fibroso pode ser observado em G_3 / T_{28} (Figura 6A).

A coloração Picosírius confirmou os achados descritos nos grupos G_1 e G_2 , sem aumento na proporção de fibras colágenas em região portal (escore 0) nos tempos (T_0 e T_{14}), como pode ser observado nas figuras 7B, 7C e 7F. Já no G_3 / T_{28} verificou-se um discreto aumento destas fibras (Figuras 7D e 7E), que estendia-se a hepatócitos periportais (zona 1). Na análise destas fibras por meio da luz polarizadas, elas eram fibras espessas e fortemente birrefringentes.

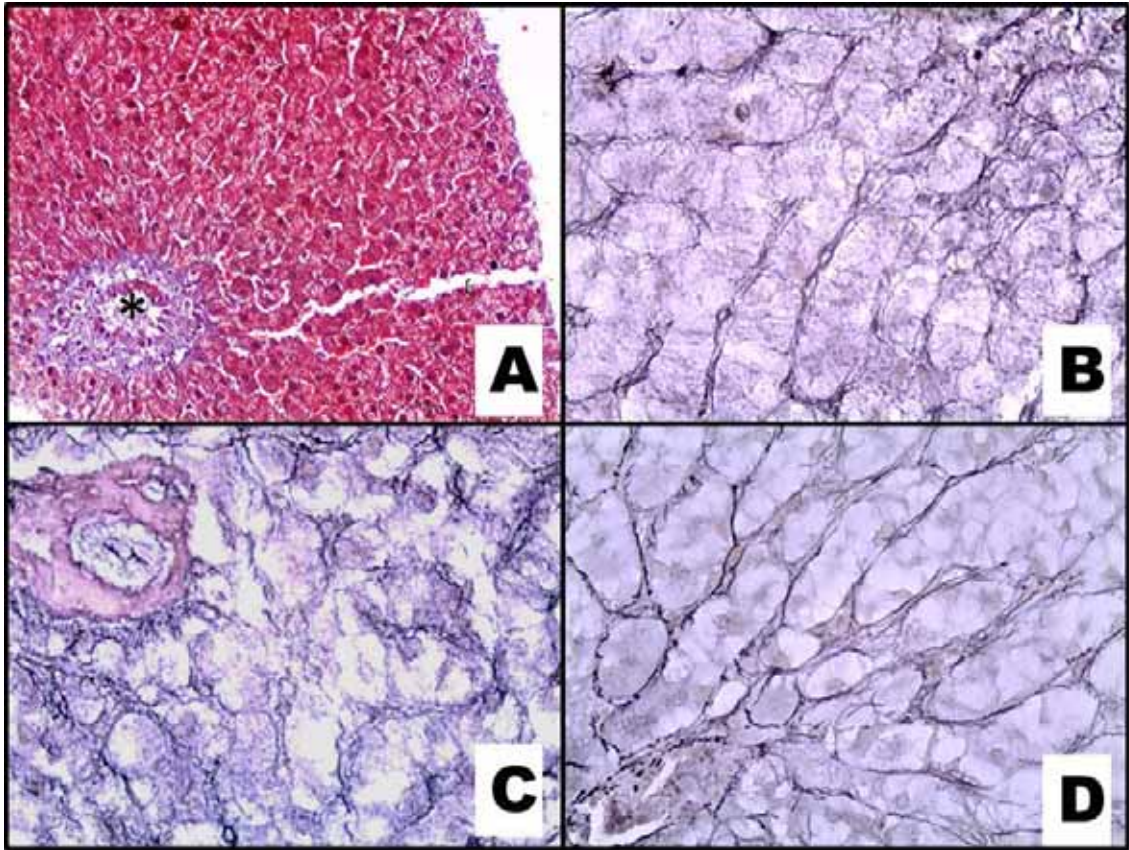


Figura 4. Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (G₁). (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Tricrômio de Masson / Obj. 20x). (B a D) Notar que não existe diferença na proporção das fibras reticulares nos tempos T₀, T₁₄, T₂₈ respectivamente (escore 0). Gordon e Sweet. Obj. 40x.

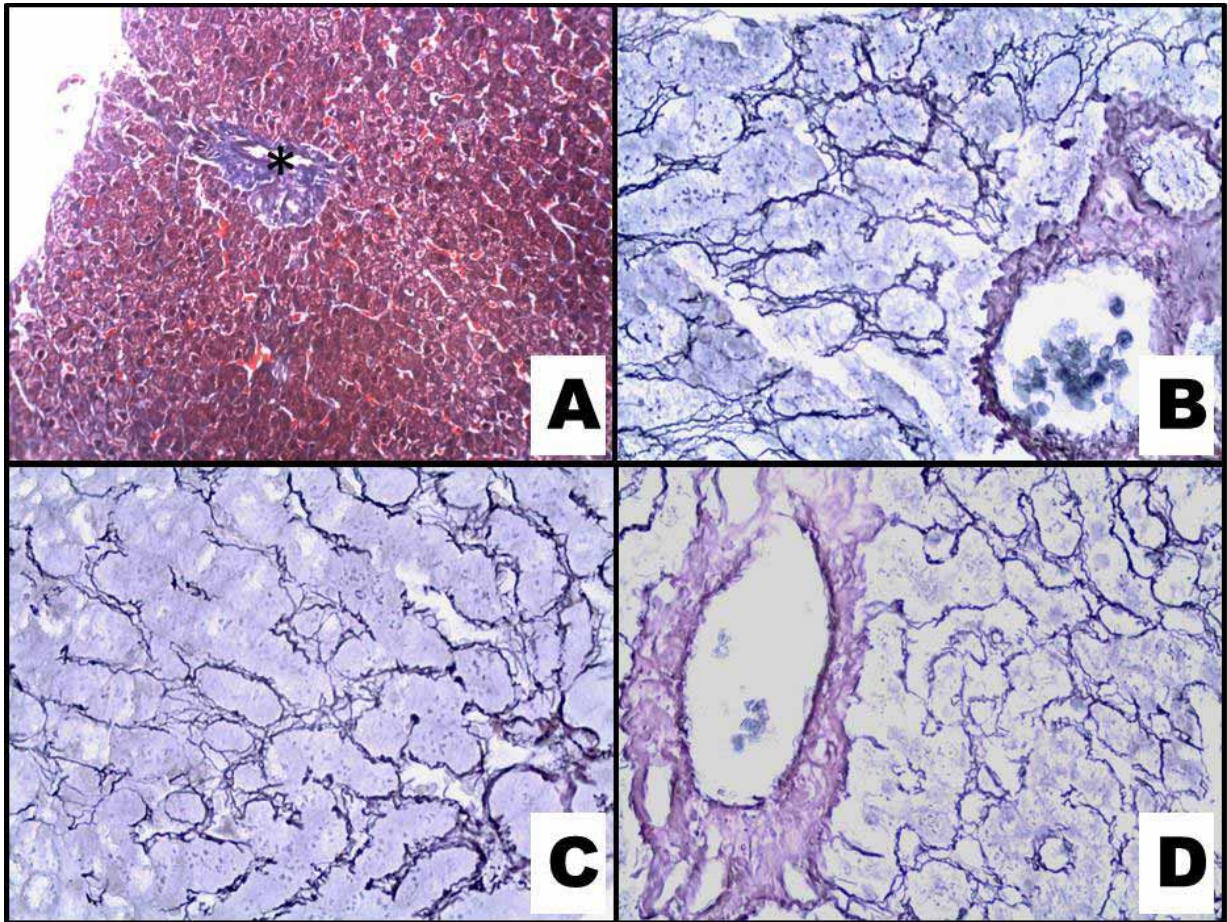


Figura 5 – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (G₂). (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Tricrômio de Masson / Obj. 20x). (B-D) Notar que não existe diferença na proporção das fibras reticulares nos tempos T₀, T₁₄, T₂₈ respectivamente (escore 0) Gordon e Sweet. Obj. 40x.

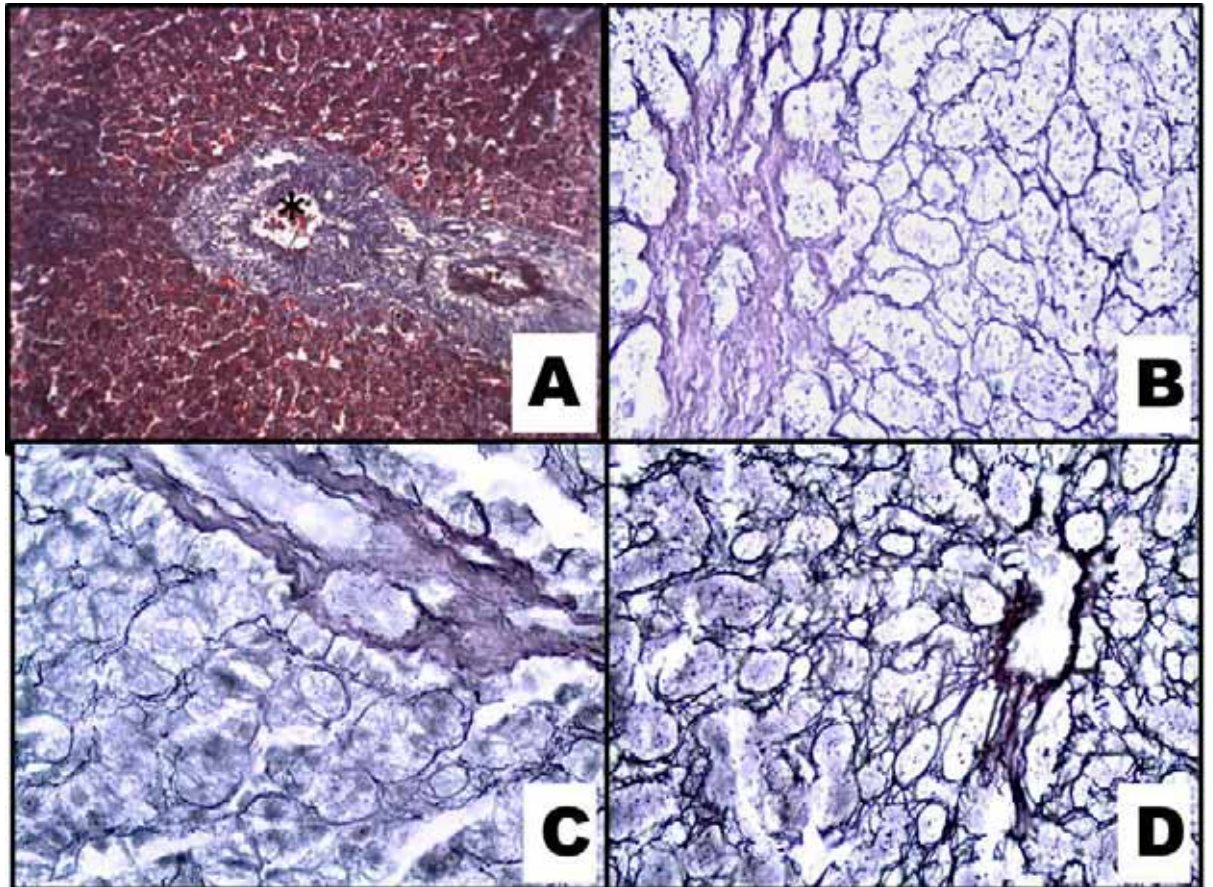


Figura 6 – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (G₃). (A) Fígado com discreto aumento de tecido fibroso (*) em região portal (Tricrômio de Masson / Obj. 20x). (B e C) Notar que não existe diferença na proporção das fibras reticulares nos tempos T₀ e T₁₄ (escore 0), mas em T₂₈ (D) verifica-se um discreto aumento em fibras reticulares (escore 1). Gordon e Sweet. Obj. 40x.

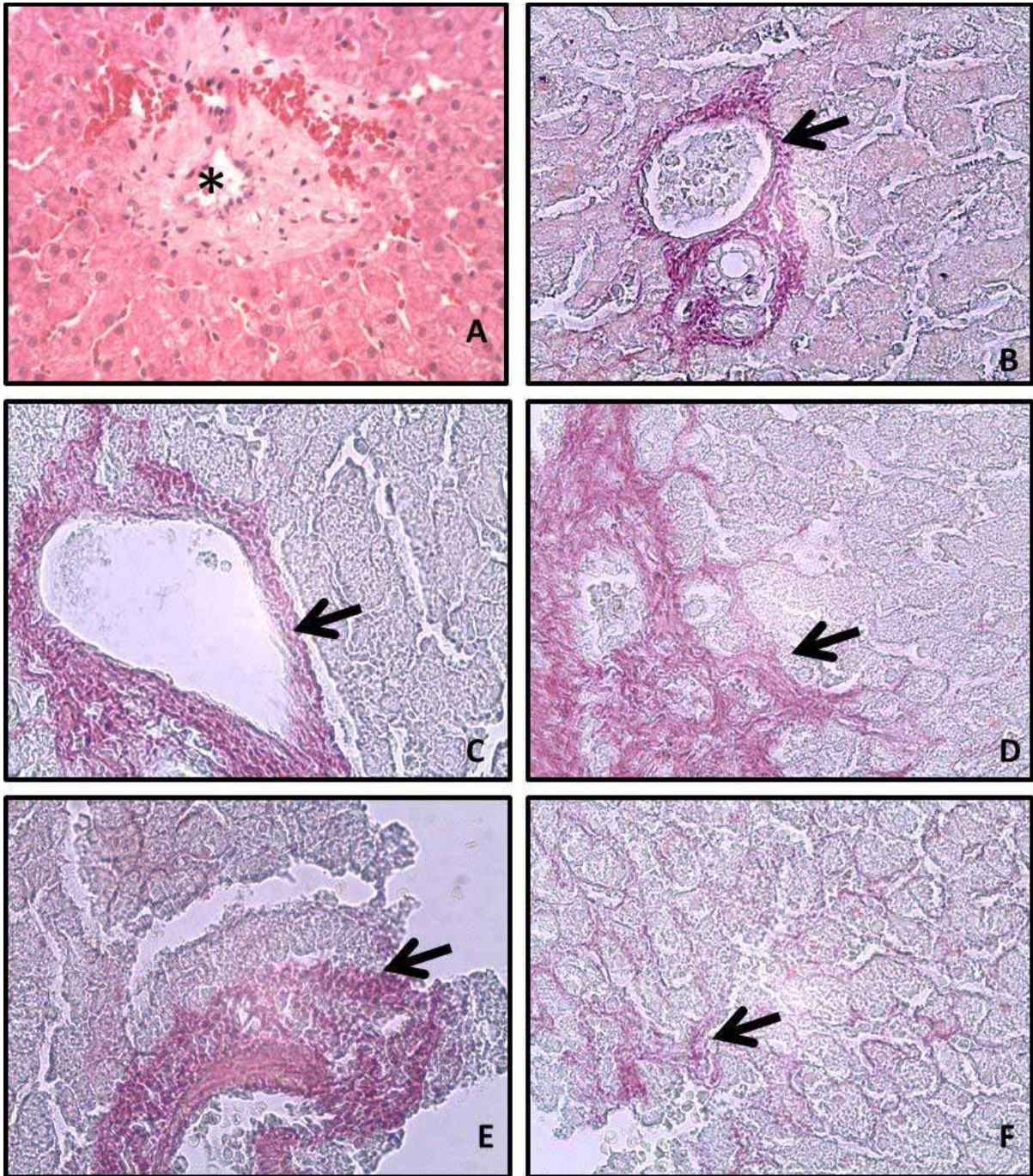


Figura 7 – Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis*. (A) Fígado com região portal (*) sem alterações (Hematoxilina e Eosina). (B,C,F) não houve alterações em fibras colágenas (D-E) Notar que existe um discreto aumento na proporção das fibras colágenas (setas) no tempo G₃ / T₂₈. Picrossirius Red. Obj. 40x.

5.2 Análise imuno-histoquímica

As imunomarcações para células estreladas hepáticas ocorreram na membrana celular. O volume celular aumentou discretamente nos tempos 14 e 28 respectivamente, em todos os grupos (Figuras 9, 10 e 11).

Na tabela 1 observam-se as médias das células estreladas hepáticas, onde foi possível verificar diferença significativa entre grupos e entre tempos. Nos grupos G₁ e G₂ verificou-se que as maiores médias de células estreladas hepáticas ocorreram no tempo T₁₄, que diferiu significativamente dos tempos T₀ e T₂₈ (P<0,05), somente no grupo G₁. No G₂ as diferenças significativas ocorreram apenas com o tempo basal (T₀), sem diferenças entre T₁₄ e T₂₈.

As médias de células estreladas hepáticas diminuíram em T₂₈, em G₁ e G₂. Entretanto não houve diferença significativa entre os grupos intoxicados (G₁, G₂, G₃) nos tempos T₁₄ e T₂₈.

No grupo G₃ houve um comportamento diferente quanto ao número de células estreladas hepáticas. A maior média ocorreu no T₀, com uma discreta redução em T₁₄ e um aumento em T₂₈, porém não houve diferença significativa entre os tempos (Tabela 1 / Figura 11).

Tabela 1. Médias e erro padrão da média de células estreladas hepáticas de cães intoxicados experimentalmente com diferentes dosagens de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₁=0,2%, G₂= 0,4% e G₃= 0,6%), a intervalos de 14 dias, por um período de 4 semanas. UNESP, Jaboticabal, 2014.

GRUPO (G)	TEMPO (dias)			Erro Padrão Médio (EPM)
	T ₀	T ₁₄	T ₂₈	
G ₁	1,5 ^{Bb}	6,0 ^{Aa}	3,5 ^{Aab}	±1,07
G ₂	1,25 ^{Bb}	5,0 ^{Aa}	4,25 ^{Aa}	±1,07
G ₃	6,75 ^{Aa}	4,75 ^{Aa}	5,75 ^{Aa}	±1,07

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05). Dados transformados em raiz quadrada da observação +1.

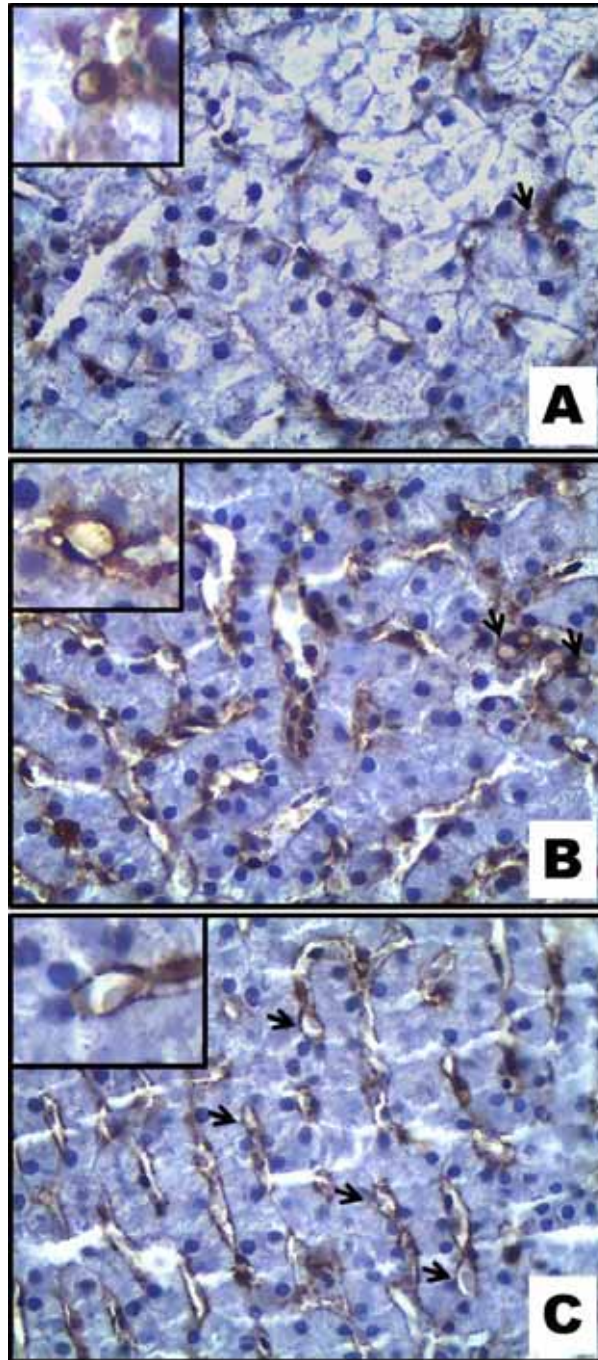


Figura 8. Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (G_1). (A-C) Notar a imunomarcagem na membrana das células estreladas hepáticas (setas) nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} respectivamente. Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Obj. 40x.

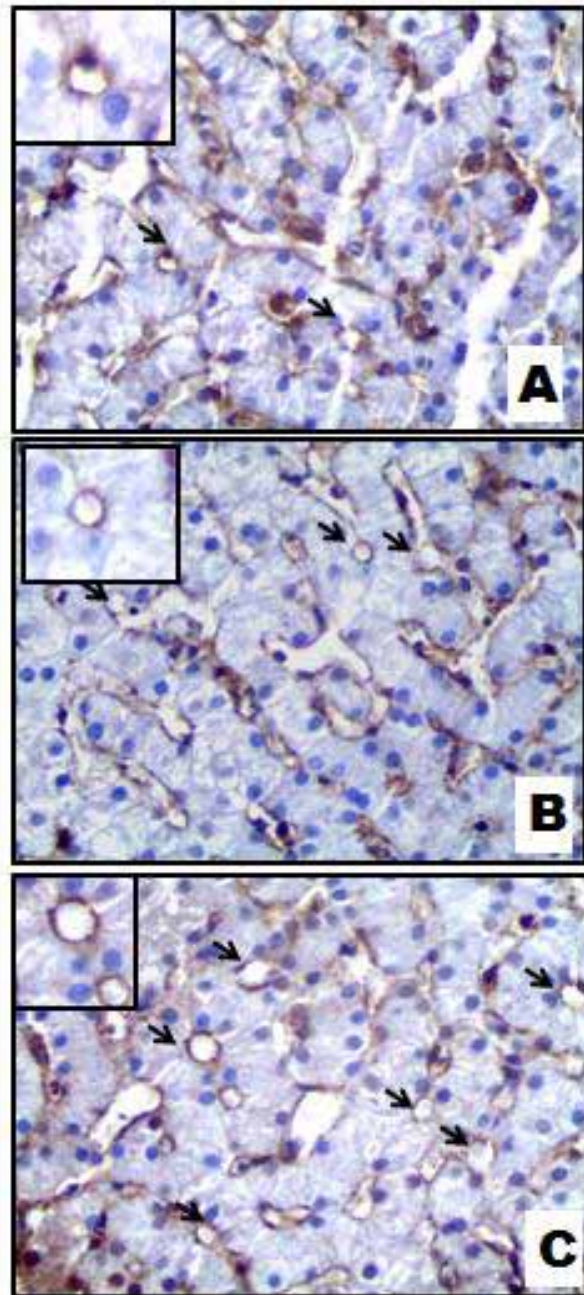


Figura 9. Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (G_2). (A-C) Notar a imunomarcção na membrana das células estreladas hepáticas (setas) nos tempos T_0 , T_{14} , T_{28} respectivamente. Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Obj. 40x

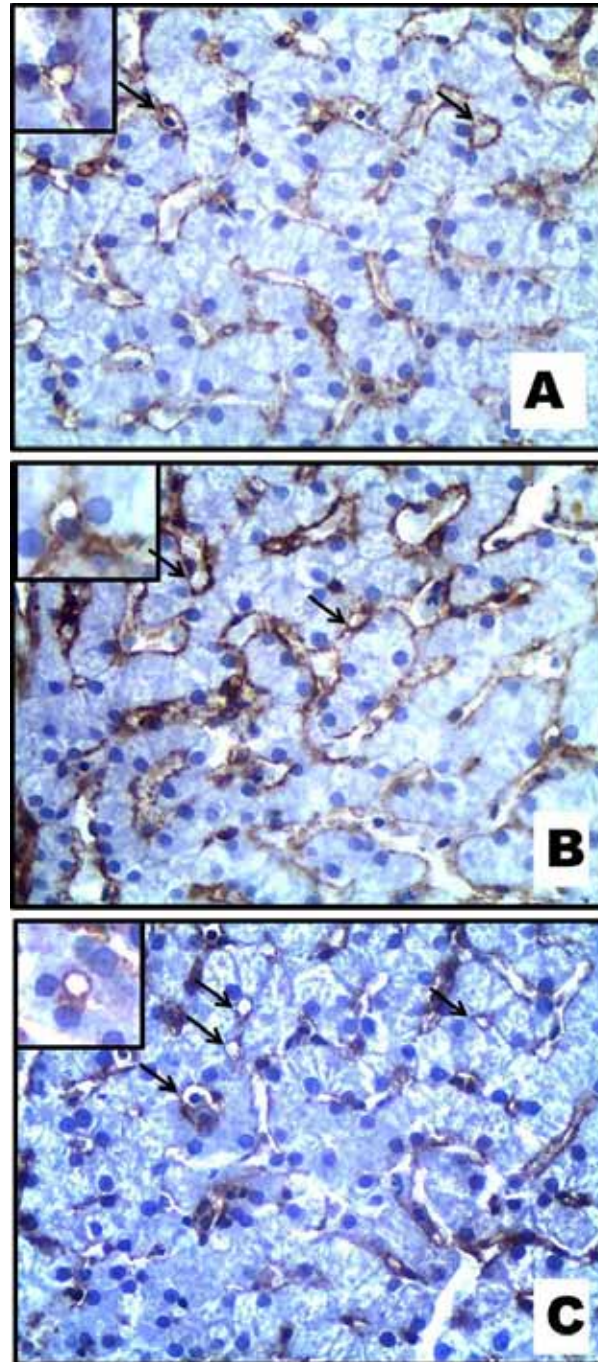


Figura 10. Fotomicrografias de fígado de cão intoxicado experimentalmente com *Crotalaria spectabilis* (G₃). (A-C) Notar a imunomarcação na membrana das células estreladas hepáticas (setas) nos tempos T₀, T₁₄, T₂₈ respectivamente, porém com maior intensidade em T₁₄. Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Obj. 40x.

Na análise de variância observou-se uma interação significativa ($P=0,019$) entre grupos x tempo, ou seja, os tratamentos não têm os mesmos comportamentos ao longo do tempo. A figura 11 ilustra as maiores densidades de células estreladas hepáticas no tempo T_{14} dos grupos G_1 e G_2 não se comportando da mesma maneira no grupo G_3 .

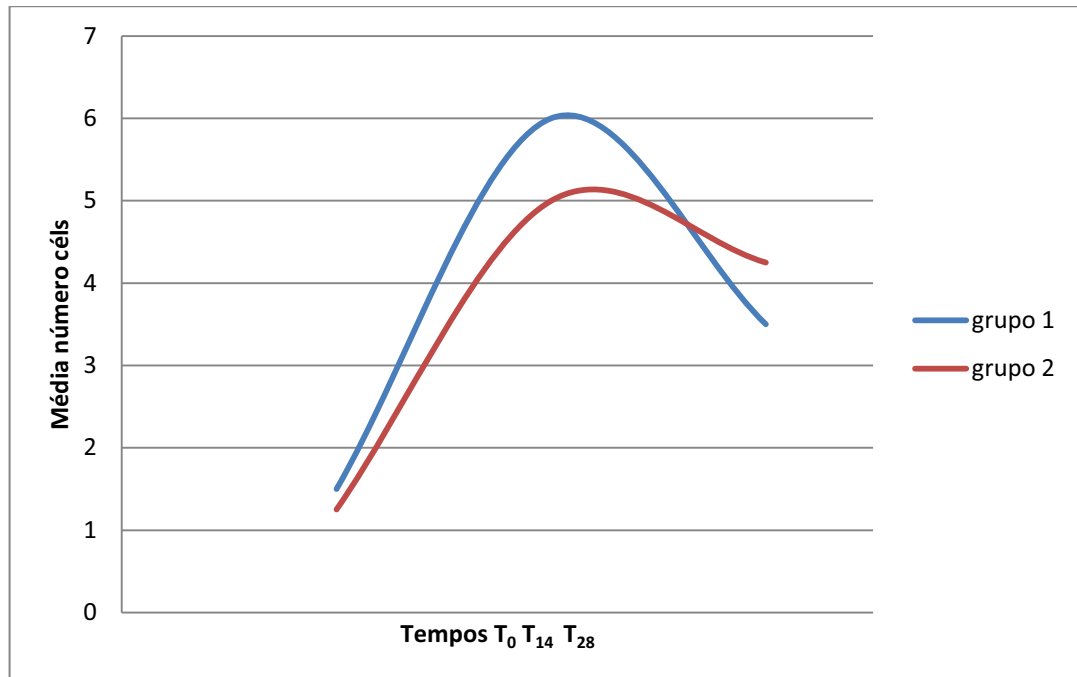


Figura 11. Valores médios de células estreladas hepáticas de cães experimentalmente intoxicados com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nos diferentes tempos (T_0 , T_{14} e T_{28}), nos grupos (G_1 , G_2).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que as de sementes de *Crotalaria spectabilis* trituradas e incluídas à ração de cães no tempo de quatro semanas (28 dias) foram hepatotóxicas para espécie estudada ($G_1 - 0,2\%$, $G_2 - 0,4\%$ e $G_3 - 0,6\%$), como foi observado em estudo anterior (BELLODI et al., 2013).

Os achados histopatológicos do fígado de cães intoxicados com as sementes de *Crotalaria spectabilis* deste estudo que foram semelhantes aos relatos de outros autores com diferentes espécies e em diferentes porcentagens de sementes tóxicas (EMMEL, 1935; BAILEY, E. M. 1978; CHEEKE e SHULL, 1985; MATTOCKS, 1986; CHEECKE, 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 et al. 2012; BELLODI et al. 2013).

FLETCHER (2009) relatou que a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos no fígado são na maioria das vezes irreversíveis, metabolizados nas células parenquimais, nos hepatócitos, especialmente pela zona três, região centro lobular. No presente estudo esta região também apresentou lesões, mostrando que o cão também é susceptível ao princípio ativo da *Crotalaria spectabilis*, como os animais de produção com intoxicação espontânea.

O peso corpóreo (Kg) dos animais não se alterou de forma significativa ao final do experimento, possivelmente pela susceptibilidade da espécie estudada ou até mesmo a pelo tempo de evolução da doença ter sido menor em relação aos demais estudos em outras espécies de animais domésticos. 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). BOGHOSSIAN et al. (2007) observaram quadro similar 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). No presente estudo a ração Puruca apresentou 200 g/Kg de proteína bruta (Anexo1). Cheeke (2009) descreveu que o incremento de aminoácidos na dieta pode favorecer a detoxificação dos APs, que no presente estudo, pode ter influenciado na intensidade das lesões hepáticas dos cães.

A escolha do anestésico Propofol® foi pela sua ação rápida, curta duração e rápida recuperação, por ter grande potencial de distribuição corpórea e metabolização em sítios extra-hepáticos. A sua metabolização se dá principalmente no pulmão. Este anestésico é rapidamente metabolizado, porém sua depuração excede a capacidade da circulação sanguínea do fígado, sugerindo mecanismos extra-hepáticos para metabolização do Propofol®, corroborando com os estudos de TSUBOKAWA e colaboradores (1998). Com isso os animais que foram submetidos a biópsia hepática não sofreram lesão hepática causada pelo processo de metabolização do anestésico.

No presente estudo a maior concentração das sementes de *Crotalaria sp.* (0,6%) e o maior tempo de evolução da lesão (T₂₈) mostrou um discreto quadro de reparação do tecido hepático. De acordo com FU et al. (2002), as lesões hepatotóxicas podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo do grau da lesão que é causada na membrana basal das células hepáticas. A fibrose é um processo de evolução crônica, que pode ocorrer em quantidades elevadas ou exposição contínua ao princípio tóxico. Assim, a necrose é um processo difuso e a fibrose é o resultado da reparação do tecido hepático. Da mesma forma, lesões que afetem as células das vias biliares, direta ou indiretamente, podem induzir tanto a morte rápida destas células ou a sua proliferação, de uma maneira desordenada (CHEEKE et al.,1988). No presente estudo foi possível verificar que a fibrose estava evidente em T₂₈ e poderia ser mais severa se o animal fosse exposto ao princípio ativo da planta por mais tempo.

A matriz extracelular desempenha um papel importante em lesões hepáticas crônicas e tem sido estudada em modelos de intoxicação experimental por TORRES e COELHO (2008). CHEEKE et al. (1988) e TORRES e COELHO (2008) afirmam ser

a fibrose hepática formada pelo evento de reparação do parênquima hepático. A principal fonte de colágeno na cirrose são as células estreladas, que quando ativadas, em situações de injúria hepática, transformam-se em miofibroblastos. Esta transformação aumenta a resistência vascular dentro do parênquima hepático, pois a contração tônica destas células comprime os sinusóides. Tanto nas injúrias aos hepatócitos quanto na fibrose hepática, os hepatócitos remanescentes são estimulados a regenerar e proliferar na forma de nódulos esféricos dentro dos limites dos septos fibrosos (nódulos regenerativos) (TORRES e COELHO, 2008). Nos animais deste estudo, a fibrose foi discreta e inicial, melhor identificada em T₂₈ e o período de intoxicação foi menor ao descrito em outras espécies animais que desenvolveram fibrose hepática como sequela da intoxicação. No entanto, os cães mostraram que são sensíveis aos alcalóides pirrolizidínicos contidos na *Crotalaria* sp., mostrando seu potencial como modelo experimental deste tipo de intoxicação.

O aumento das células estreladas hepáticas no tempo T₁₄ dos grupos G₁ e G₂, também podem estar diretamente relacionados com a sua ativação, e a mudança no seu fenótipo. Segundo YIN e colaboradores (2013), elas secretam citocinas e fatores de crescimento que irão promover a regeneração do tecido hepático. A citocina TGF- β também contribui para a ativação das células estreladas hepáticas e estimula a formação de colágeno, contribuindo para o aumento da MEC. No presente estudo, a maior densidade de células estreladas hepáticas aos 14 dias pós-intoxicação sugere que elas foram ativadas pela injúria hepatotóxica e proliferaram nesta fase. A redução desta população foi observada nos 28 dias após a administração das sementes junto a ração e coincidiu com a fibrose do parênquima hepático. Em um estudo anterior deste grupo de pesquisa, nos mesmos animais, verificou-se que a enzima Gamaglutamiltransferase (GGT) encontrou-se aumentada no grupo 2 até o final do experimento, só diminuiu após a retirada do agente agressor, as sementes moídas na ração dos animais.

A intoxicação por *Crotalaria* sp. com evolução de 30 dias ou mais caracteriza uma intoxicação crônica e poderia levar a ativação das células estreladas iniciando o processo de fibrose do fígado. Evidências clínicas e experimentais recentes indicaram que a fibrose hepática é reversível após a remoção do agente e que durante a regressão da fibrose hepática o número de células estreladas hepáticas

ativadas pode reduzir por apoptose ou pelo retorno ao seu estado quiescente. No presente estudo, a diminuição de células estreladas no T₂₈ poderia estar relacionada a este aspecto.

Friedman (2008) citou em seus estudos, que há uma série de fatores relacionados com a ativação das células estreladas hepáticas, quimiocinas, proteínas entre outras. Ao longo das transformações ocorridas, essas células perdem suas longas projeções citoplasmáticas que circundam as células endoteliais fazendo contato com hepatócito e assim dando início a modificação do seu fenótipo, passando de uma célula estrelada hepática quiescente para um estado ativado. No presente estudo foi possível observar esta relação entre as células estreladas hepáticas e os hepatócitos, pois as imunomarcações ocorreram na membrana citoplasmática das mesmas, mas estendia-se aos sinusóides e hepatócitos adjacentes. Possivelmente, com a injúria ao hepatócito ocorra a ativação destas células por liberação de mediadores inflamatórios, que juntamente com as células de Kupffer, também ativadas, “informem” as células estreladas do fígado da necessidade de mudar seu fenótipo e sintetizar componentes da MEC. Friedman (2008) também destaca a capacidade das mesmas em modular o processo inflamatório hepático juntamente com as células de Kupffer. Futuros estudos seriam necessários para avaliar quais citocinas ou quimiocinas são produzidas no fígado e quais células as produzem durante os processos hepatotóxicos.

No grupo G₃, uma possível explicação para o aumento de células estreladas hepáticas em T₀ seria que os animais deste grupo já estariam com alguma lesão hepática prévia, a qual pode ter contribuído para a proliferação destas células mesmo no tempo basal. THRALL (2007) menciona que enzimas de extravasamento e indução de lesão podem aumentar ou não em vários tipos de doenças hepáticas, a intensidade da lesão é relativa a esse aumento pode fornecer indícios de lesão hepática primária ou crônica.

Em face aos resultados obtidos neste estudo e da importância das células estreladas hepáticas na patogênese das hepatopatias, destaca-se a necessidade de pesquisas sobre o papel das células estreladas hepáticas em modelos de intoxicação hepática em cães, considerando a escassez de estudos com este enfoque na literatura. Da mesma forma, estudos que avaliem a qualidade das rações

disponíveis no mercado *pet* e a presença ou não de lesões hepáticas seriam importantes, pois hoje os cães e gatos estão inseridos como membros das famílias.

7. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo foi possível concluir que:

- A fibrose hepática foi observada de forma discreta aos 28 dias pós-intoxicação nas maiores concentrações de sementes de *Crotalaria spectabilis* (G₃ – 0,6%).
- As células estreladas hepáticas aumentaram em número no 14^o dia da intoxicação dos cães com sementes de *Crotalaria spectabilis*, sugerindo um processo de ativação secundário a injúria hepatotóxica, nos grupos G₁ e G₂.
- As células estreladas hepáticas diminuíram em número no 28^o dia da intoxicação dos cães com sementes de *Crotalaria spectabilis* (nos mesmos grupos), o qual coincidiu com a fibrose, sugerindo que as mesmas estavam retornando ao seu estado quiescente ou sofrendo apoptose.

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.

BARROS, C. S. L. **Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino**. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Ed.). Patologia veterinária. São Paulo: Roca, 2011. cap. 4, p. 183-290.

BELLODI, C; HATAYDE, M.R.; VASCONCELOS, R.O. Características histopatológicas de fígado de cães intoxicados experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis*. **Pubvet**. v 7, n. 25, ed. 248, 2013.

BOGHOSSIAN, M. R.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M.F.; TOKARNIA, C.H. Aspectos clinico-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (*Fabaceae*) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, v. 4, p. 149-156, 2007.

BRANDÃO, D.F, RAMALHO, L.N.Z, RAMALHO, F.S, ZUCOLOTO, S., MARTINELLI, A.L, SILVA, O.C. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, suplemento 1, p. 1285-93, 2006.

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.

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

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

CLARKE, E. C. G.; CLARKE, M. L. **Garner's Veterinary Toxicology**. 3 ed. 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.

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.

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

FRIEDMAN, SCOTT L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the liver. **Physiology Rev.**, n.88, p.125-172, 2008.

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.

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.

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

JUNQUEIRA, L.C, CARNEIRO, J. In: **Tecido conjuntivo**. Histologia Básica. 10 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

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.

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.

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

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brazilian 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.; HATAYDE, M. R. ; CANOLA, J. C. ; GARRIDO, E. ; SANCHES, D. C. C. . Intoxicação experimental de equinos por sementes de *Crotalaria spectabilis*. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, v. 02, p. 10-14, 2012.

MONTES, G.S. Structural Biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p.15-27, 1996.

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

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

REEVES, H.L, FRIEDMAN, S.C. Activation of hepatic stellat cells – a key issue in liver fibrosis. **Frontiers in Bioscience**. v. 7, p. 808-826, 2002.

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.

SÁNCHEZ, D.C.C. Evidências clínico-patológicas de ovinos intoxicados experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae). 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV-UNESP Jaboticabal, 2011.

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 equinos 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 retusa* – 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.

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.

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.

TSUBOKAWA, T.; YAMAMOTO, K.; NISHIMURA, K.; YAGI, T.; KOBAYASHI, T. Effects of inhaled oxygen concentration on fat metabolism during propofol infusion in rabbits. **British Journal of Anaesthesia**, v. 81, p. 761-765, 1998.

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.

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, seneciphylline, retrorsine, monocrotaline, and trichodesmine in the isolated, perfused rat liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 133, p. 277-284, 1995.

YIN CHUNYUE, KIMBERLEY J., KINJI ASAHINA, DIDIER STAINIER. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 123, n.5, 2013.

ANEXO 1

Composição nutricional básica da ração Puruca® carne e vegetais para cães adultos:

Informação Nutricional			
Ácido fólico (min)	0,40 mg/kg	Matéria mineral (max)	110,00 g/kg
Ácido pantotênico (min)	12,00 mg/kg	Niacina (min)	18,00 mg/kg
Biotina (min)	0,15 mg/kg	Piridoxina (min)	2,50 mg/kg
Cálcio (max)	23,00 g/kg	Proteína bruta (min)	200,00 g/kg
Cálcio (min)	6.000,00 mg/kg	Riboflavina (min)	4,00 mg/kg
Cobalto (min)	0,90 mg/kg	Selênio (min)	0,25 mg/kg
Cobre (min)	12,00 mg/kg	Tiamina (min)	2,50 mg/kg
Colina (min)	650,00 mg/kg	Umidade (max)	120,00 g/kg
Extrato etéreo (min)	60,00 g/kg	Vitamina A (min)	8.000,00 UI/kg
Ferro (min)	60,00 mg/kg	Vitamina B12 (min)	20,00 mcg/kg
Fósforo (min)	6.000,00 mg/kg	Vitamina D3 (min)	800,00 UI/kg
Iodo (min)	1,50 mg/kg	Vitamina E (min)	30,00 UI/kg
Manganês (min)	20,00 mg/kg	Vitamina K (min)	1,50 mg/kg
Matéria fibrosa (max)	60,00 g/kg	Zinco (min)	90,00 mg/kg

Fonte: <http://www.basaalimentos.com.br/racoes-para-caes/linha-puruca/puruca-adulto-carne/>