

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

APRIMORANDO: Alexandre Agreli de Melo
ORIENTADOR: Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde

TÍTULO DO TRABALHO: Intoxicação experimental em eqüinos com sementes
de *Crotalaria spectabilis*

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional /CRH/SES-SP e FUNDAP, elaborada no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Jaboticabal.

Área: Clínica Médica de Grandes Animais

JABOTICABAL - SP
2010

M528i Melo, Alexandre Agreli
Intoxicação experimental em eqüinos com sementes de
Crotalaria spectabilis / Alexandre Agreli de Melo. --Jaboticabal 2010
vi, 65 f. il. ; 29 cm

Trabalho apresentado ao Programa de Aprimoramento
Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal para conclusão de
Residência Médico Veterinária, 2010

Orientador: Mario Roberto Hatayde

Banca examinadora: Delphim da Graça Macoris, Julio Carlos
Canola

Bibliografia

1. Intoxicação. 2. Equinos. 3. *Crotalaria spectabilis* I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.9:636.1

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

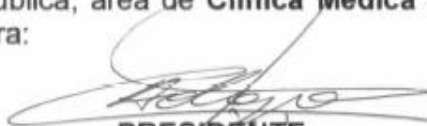
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE EQUINOS POR SEMENTES DE CROTALARIA SPECTABILIS

AUTOR: Alexandre Agreli de Melo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Certificado de Conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, área de **Clínica Médica de Grandes Animais**, pela Banca Examinadora:



PRESIDENTE

Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde



MEMBRO 1


Prof. Dr. Delphim da Graça Macoris



MEMBRO 2

Prof. Dr. Julio Carlos Canola

Data da realização: 21/01/2010



Presidente da Banca Examinadora
Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS-----	ii
LISTA DE TABELAS-----	iii
RESUMO-----	iv
ABSTRACT-----	v
1- INTRODUÇÃO-----	1
2- JUSTIFICATIVA-----	14
3- OBJETIVOS-----	15
3.1- Objetivo geral-----	15
3.2- Objetivo específico-----	15
4- MATERIAL E MÉTODOS-----	16
4.1- Animais e instalações-----	16
4.2- Acompanhamento da indução de intoxicação por <i>Crotalaria spectabilis</i> -----	16
4.3- Colheita de material biológico-----	17
4.3.1- Amostras de sangue-----	17
4.3.2- Amostras de fígado-----	17
4.4- Métodos analíticos-----	18
4.4.1- Amostras de sangue (soro e sangue total)-	18
4.4.1.1- Hemograma e leucograma completos----	18
4.4.1.2- Esfregaço sanguíneo-----	18
4.4.1.3- Avaliação das funções hepática e renal--	19
4.5- Exame histológico-----	19
4.5.1- Microscopia óptica-----	19
4.6- Procedimento pós-experimento-----	19
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	20
5.1- Avaliação clínica dos animais durante período de intoxicação-----	20
5.2- Hemograma e leucograma-----	25

5.3- Valores bioquímicos dos animais-----	32
5.4- Alterações hepáticas microscópicas-----	37
5.5- Observações finais-----	41
6- CONCLUSÃO-----	42
7- REFERÊNCIAS-----	43
APÊNDICES-----	57
Apêndice A- Tabelas dos parâmetros fisiológicos dos animais intoxicados por sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> -----	58
Apêndice B – Tabelas do hemograma e leucograma dos animais intoxicados por sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> -----	62
Apêndice C – Tabelas dos valores bioquímicos dos animais intoxicados por sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> -----	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1-----	3
Figura 2-----	20
Figura 3-----	21
Figura 4-----	21
Figura 5-----	22
Figura 6-----	23
Figura 7-----	23
Figura 8-----	24
Figura 9-----	24
Figura 10-----	25
Figura 11-----	27
Figura 12-----	28
Figura 13-----	28
Figura 14-----	29
Figura 15-----	29
Figura 16-----	30
Figura 17-----	30
Figura 18-----	31
Figura 19-----	31
Figura 20-----	32
Figura 21-----	32
Figura 22-----	33
Figura 23-----	34
Figura 24-----	34
Figura 25-----	35
Figura 26-----	35
Figura 27-----	36
Figura 28-----	36
Figura 29-----	39
Figura 30-----	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1-----	20
Tabela 2-----	26
Tabela 3-----	26
Tabela 4-----	33
Tabela 5-----	37
Tabela 6-----	37
Tabela 7-----	38
Tabela 8-----	38
Tabela 1A-----	58
Tabela 2A-----	59
Tabela 3A-----	60
Tabela 4A-----	61
Tabela 1B-----	62
Tabela 2B-----	62
Tabela 3B-----	62
Tabela 4B-----	62
Tabela 5B-----	63
Tabela 6B-----	63
Tabela 7B-----	63
Tabela 8B-----	63
Tabela 1C-----	64
Tabela 2C-----	64
Tabela 3C-----	64
Tabela 4C-----	65

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE EQUINOS POR SEMENTES DE *CROTALARIA spectabilis*

RESUMO- Foram utilizados 04 eqüinos, sem raça definida (SRD), hígidos, com idade aproximada de 10 anos, peso entre 330 kg e 350kg. Os equinos dos tratamentos 1, 2, 3 e 4 receberam, durante 21 dias, ração com respectivamente: 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% de sementes de *Crotalaria spectabilis*. Não houve alterações dos parâmetros clínicos e dos níveis de creatinina nos animais intoxicados. O perfil hematológico teve discretas alterações. Os níveis de GGT tiveram uma pequena elevação nos animais intoxicados com 0,4%; 0,6%, e 1% de sementes de *Crotalaria spectabilis* na ração e as alterações microscópicas hepáticas encontradas foram: infiltrado inflamatório, esteatose, necrose celular, cariocitose e fibrose periportal. Os resultados deste experimento indicam que ração contaminada com sementes de *Crotalaria spectabilis*, nas proporções utilizadas, foi tóxica para equinos.

Palavras-Chave: *Crotalaria spectabilis*, equinos, intoxicação

EXPERIMENTAL POISONING OF HORSES BY *CROTALARIA spectabilis* SEEDS

ABSTRACT- It used 04 horses, crossbred (SRD), healthy, aged approximately 10 years, weight between 330 kg and 350kg. Horses of group 1, 2, 3 and 4 were fed for 21 days, feed with respectively 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0% of seeds of *Crotalaria spectabilis*. There were no changes in clinical parameters and the levels of creatinine in the calf. The hematological profile was mild changes. GGT levels were slightly elevated in animals poisoned with 0.4%, 0.6% and 1% of seeds of *Crotalaria spectabilis* in the diet and microscopic liver changes were: inflammatory infiltration, steatosis, cell necrosis, and cariocitose fibrosis. The results of these experiments indicate that feed contaminated with seeds of *Crotalaria spectabilis*, the proportions used, was toxic to horses.

Keywords: *Crotalaria spectabilis*, horses, poisoning

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as intoxicações por plantas em animais de produção, são conhecidas desde que os pioneiros Espanhóis e Portugueses introduziram as primeiras cabeças de gado em pastagens naturais da região. As perdas econômicas ocasionadas pelas intoxicações por plantas podem ser definidas como diretas ou indiretas. As perdas diretas são causadas pelas mortes de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas à doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã, e aumento à susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica. As perdas indiretas incluem os custos de controlar as plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de gado para substituir os animais mortos, e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e ao tratamento dos animais afetados. As perdas econômicas causadas pelas intoxicações por plantas são difíceis de se estimar por que não existem dados confiáveis sobre todos esses componentes, no entanto, as perdas causadas por mortes são fáceis de determinar quando se dispõem de dados elaborados por laboratórios de diagnóstico, sobre a frequência das causas de mortes numa determinada região (RIET-CORREA et al., 1993; JAMES, 1994).

Plantas do gênero *Crotalaria* são conhecidas por "xique-xique", "guizo-de-cascavel" ou "chocalho-de-cascavel", pois os frutos, quando secos, produzem som semelhante ao de chocalho ao serem tocados. Também em função disso é que a planta recebeu o nome científico de *Crotalaria*, termo que em latim significa chocalho. No Brasil já foi registrada a ocorrência de, pelo menos, 40 espécies de *Crotalaria* (BARROSO, 1974; EVERIST, 1974; TOKARNIA et al., 2000). No mundo, mais de 600 espécies do gênero *Crotalaria* são encontradas em diversas regiões sendo a maioria tóxica para animais (WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987). As variedades tóxicas mais conhecidas são *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria crispata*, *Crotalaria retusa*, *Crotalaria*

dura e *Crotalaria globifera* (BARRI & ADAM, 1981). Essas plantas são ricas em alcalóides pirrolizidínicos (AP) que são as principais toxinas derivadas de plantas que acometem seres humanos e animais (MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1990). Uma revisão da literatura (WHO, 1988) mostra que, entre as plantas que contêm pirrolizidinas, *Crotalaria spp.* causam danos em vários tecidos na maioria das espécies animais. Algumas espécies de *crotalaria* são pneumotóxicas para equinos, bovinos, ovinos e suínos, além de hepatotóxicas. Em suínos, sabe-se que as *Crotalaria spp.* são bastante nefrotóxicas. A *Crotalaria retusa*, porém, constitui exceção; em equinos produz somente doença hepática (NOBRE et al., 2004a,b).

As plantas do gênero *crotalaria* são amplamente utilizadas como adubação verde, destinadas à recuperação de solos empobrecidos. Nesse sistema, a *crotalaria* é plantada e posteriormente incorporada no solo, havendo assim melhora no conteúdo de compostos nitrogenados essenciais em outras culturas (JOLY, 1977; LORENZI, 1991).

Em diversos países foram descritos casos de intoxicação por *crotalaria*, contendo alcalóides pirrolizidínicos (APs), em equinos (GIBBONS et al., 1953; GARDINER et al., 1965; ARZT & MOUNT, 1999; PITT & MCKENZIE, 2002), bovinos (BARRI & ADAM, 1981; WINTER et al., 1990), suínos (PECKHAM et al., 1974; MCGRATH & DUNCAN, 1975 ; SOUZA et al., 1997 ; SOUZA et al., 1998; HATAYDE et al., 2008), aves (NORTON & O'ROURKE, 1979; ALFONSO et al., 1993 ; HATAYDE et al., 1997a,b ; HATAYDE et al., 1998) e caprinos (BARRI & ADAM, 1984). *Crotalaria retusa* e *Crotalaria crispata* são responsáveis pela doença denominada "Kimberley horse disease" ou "Walkabout disease" na Austrália (ROSE et al., 1957a,b; GARDINER et al., 1965).

Nos Estados Unidos da América, a *Crotalaria spectabilis* tem sido usada extensivamente como adubação verde em solos leves e se espalhou, tornando-se silvestre. É tida como a *crotalaria* mais tóxica. Casos naturais de intoxicação têm sido descritos em equinos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves (CLARKE & CLARKE, 1967). Segundo LORENZI (1991), a *Crotalaria spectabilis* é uma planta anual, subarborescente, ereta, ramificada, glabra, medindo 70 a 100 cm de altura, com reprodução por sementes. Sua folhas são simples, mucronadas no ápice, glabras na face superior e

pubescentes na inferior, com 6 a 12 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura, estípulas de 5 a 7 cm de comprimento. Apresentam flores amarelas, crescem em racemos terminais e axilares de até 30 cm de comprimento com 20 a 40 flores. A Figura 1 ilustra um exemplar de *Crotalaria spectabilis*.



Figura 1. *Crotalaria spectabilis*.
Fonte: www.missouriplants.com, 13/01/10

As vagens com sementes imaturas são verdes, escurecem gradualmente até tornarem-se pretas quando maduras. As sementes são firmes, pretas e lustrosas, medem 4x3x2 cm e pesam 13,8 mg em média.

Segundo a Portaria n.º. 845 de 08 de novembro de 1976, disponível na página digital da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), impurezas são consideradas as do próprio produto bem como os grãos ou fragmentos de grãos que vazarem numa peneira de crivos circulares de 5mm (cinco milímetros) de diâmetro. Portanto, as sementes de crotalaria passam na peneira e são consideradas impurezas presentes em uma ração animal.

A crotalaria, especialmente a *Crotalaria spectabilis* e a *Crotalaria giant striata* variedade da *Crotalaria mucronata*, cresce vastamente na planície costeira da Carolina do Norte, como plantas nativas. A grande quantidade de húmus e nitrogênio, adicionada ao solo pela crotalária, aumenta marcadamente a produção de milho e soja, plantados. Infelizmente, a crotalaria cresce espontaneamente nessas plantações e as suas sementes são inadvertidamente colhidas com o milho ou a soja, pelas práticas comuns de colheita mecanizada. Quando esses produtos contaminados são ingeridos,

produzem efeitos deletérios nos animais (SMITH & OSBORNE, 1962). O seu 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).

No período mais seco do ano, com o pasto seco, os animais tendem a procurar as áreas ribeirinhas de açudes e áreas irrigadas a procura de pasto verde, podendo ingerir crotalaria. Na região semi-árida do Brasil as estações do ano não são bem estabelecidas, percebendo-se apenas duas estações, a das chuvas (janeiro a junho) e a da estiagem (julho a dezembro). O período de chuvas é bastante irregular e em alguns anos quase não chove nesta região. No primeiro período do ano a *Crotalaria retusa* brota em áreas de baixio, próximo a açudes e rios temporários. Nos primeiros meses da estação seca é vista na fase adulta, com sementes, sendo abundante nas áreas referidas, muitas vezes se constituindo na única planta verde. Nos meses de novembro e dezembro ocorre escassez da planta, nas áreas irrigadas e próximas a açudes ela ainda está presente, em diversos estágios de crescimento (brotação, floração e sementes). Apesar das diferenças na distribuição das chuvas e, portanto, da disponibilidade de forragem nas duas épocas do ano, não foi constatada distribuição sazonal da enfermidade. (NOBRE et al., 2004b).

Na Austrália a incidência parece ser sazonal, com os animais ingerindo a planta nos meses chuvosos (janeiro, fevereiro e março) e adoecendo num período variável de 3 a 6 meses após a ingestão. Em áreas onde a incidência é particularmente alta, um apreciável número de casos ocorre no período seco, de novembro a dezembro (ROSE et al, 1957a). Na Ilha de Páscoa (Chile) a intoxicação por *Crotalaria spp* em equinos é sazonal, ocorrendo à maioria dos casos no verão (dezembro a fevereiro), período em que o pasto geralmente é seco (NARLESKY, 1999; ARZT & MOUNT, 1999). Segundo PECKHAM et al. (1974) e HOOPER & SCANLAN (1977), a ingestão de *Crotalaria sp* ocorre quando há escassez de pastagem ou quando há a contaminação de alimentos ou ração pela planta ou pelas sementes. É importante salientar, também, que equinos sob condições de estresse metabólico ou nutricional e na gravidez apresentam mais facilmente a doença (CURRAN et al. 1996). CRAIG et al. (1991) observou que as diferentes respostas ou resistência individual dos animais as pirrolizidinas podem

refletir: a detoxificação bacteriana no trato gastrointestinal; a taxa de conversão, no fígado, dos AP a pirróis tóxicos; e a capacidade anti-oxidativa individual do animal. A quantidade de AP ingerida na alimentação também é importante. FU et al. (2002) relataram ainda, que a diferença entre a susceptibilidade das espécies à toxicidade desses alcalóides está relacionada com o balanço existente entre a formação de metabólitos pirrólicos tóxicos e os processos de detoxificação gerado por hidrólise dos metabólitos e/ou formação de N-óxidos não tóxicos.

No Brasil, plantas do gênero *Crotalaria* vem sendo utilizada na adubação verde desde o início do século passado. GRANATO (1924) definia adubação verde como prática agrícola programada que consiste na incorporação ou não de matéria vegetal, com a finalidade de manter ou melhorar as condições físicas, químicas e biológicas do solo. VITTI et al. (1979), utilizando cinco espécies de leguminosas num latossolo vermelho-amarelo fase arenosa, verificaram aumento de C, Al, H, e CTC e diminuição nos teores trocáveis (K, Ca, Mg), P e pH, do solo, com a incorporação de adubos verdes. Por sua vez, NOGUEIRA et al (1989) constataram incrementos nos teores de matéria orgânica e cálcio e redução nos teores de fósforo em solo aluvial, quando cultivado com *Crotalaria juncea* como adubo verde. SKÓRA NETO (1993), estudando consorciação de leguminosas com milho, verificou redução na infestação da área com plantas invasoras durante e após a colheita, sendo este efeito variável, conforme a espécie e a época da consorciação.

O princípio ativo da *Crotalaria* spp. são alcalóides pirrolizidínicos, dentre eles o principal é a monocrotalina. Essas substâncias são hepatotoxinas que afetam preferencialmente o fígado, mas podem causar lesões também, em pulmões e outros órgãos. Após absorção no trato alimentar estes alcalóides são metabolizados no fígado e convertidos a derivados pirrólicos altamente reativos (CHEEKE, 1998).

Os alcalóides pirrolizodínicos (APs) são constituintes comuns de uma centena de espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias e distribuídas em diversas regiões geográficas do mundo. Aproximadamente, 3% das plantas que florescem no mundo contém APs considerados tóxicos. Os APs são encontrados em mais de 20 grandes famílias de plantas, entretanto, apenas três famílias - Boraginaceae,

Compositae (Asteraceae), e Leguminosae (Fabaceae) - , contém os alcalóides considerados mais tóxicos (FU et al.,2002). WILLIAMS & MOLYNEUX (1987), estudando a concentração de APs em sementes de 41 espécies de crotalaria, verificaram que nas amostras de *Crotalaria spectabilis* havia maior quantidade de APs, quando comparadas com as outras; ressalta-se que essas sementes eram provenientes do Brasil. Os APs constituem um grande grupo de moléculas de caráter básico que contém nitrogênio em sua estrutura, normalmente formando um anel heterocíclico, o núcleo pirrolizidínico, sendo amplamente disseminados, tanto geograficamente quanto botanicamente (McLEAN, 1970; CHEECKE & SHULL, 1985; PRAKASH et al., 1999). Muitos desses alcalóides são hepatotóxicos e outros são pneumotóxicos, neurotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (CHEECKE, 1988; CHEECKE, 1998; PRAKASH et al., 1999; YAN & HUXTABLE, 1995). Entretanto, postula-se que, para exercerem efeitos tóxicos, os AP necessitam ser ativados pelo sistema enzimático citocromo P450 dos hepatócitos, que ativam esses compostos aos chamados dehidroalcalóides ou pirróis (MATTOCKS, 1986). Esses compostos funcionam como agentes alquilantes de macromoléculas celulares, formando adutos que iniciam uma toxicidade aguda ou crônica (CULVENOR et al., 1962).

A monocrotalina (MCT) é o principal AP encontrado nas plantas do gênero crotalaria e, embora seja um alcalóide primariamente hepatotóxico, efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotóxicos, fetotóxicos e carcinogênicos também estão relacionados a ele (MATTOCKS, 1986; THOMAS et al., 1996; RIBEIRO et al., 1993; CHEECKE, 1998; MEDEIROS et al., 2000). Equinos intoxicados com MCT, muitas vezes, apresentam sintomatologia nervosa, o que tem sido associado a um quadro de encefalopatia hepática devido à impossibilidade de metabolização da uréia seguido de hiperamonemia. Por outro lado, metabólitos da MCT já foram encontrados e dosados em cérebros de ratos experimentalmente intoxicados, o que demonstra a capacidade dessas moléculas de atravessar a barreira hemato-encefálica (YAN e HUXTABLE,1995).

A monocrotalina é um alcalóide tipo retronecina, formado por uma base de necina (retronecina) com uma dupla ligação entre os carbonos 1 e 2, associada a um

ácido necínico (ácido monocrotálico), que além de efeito tóxico apresenta também atividade tumorigênica. Os ácidos necínicos contêm de quatro a seis átomos de carbono podendo ser ácidos mono ou dicarboxílicos, sendo encontrados principalmente, nos alcalóides pirrolizídínicos que exibem efeitos tóxicos e são derivados de ésteres de álcoois básicos. (TAYLOR et al., 1997; FU et al., 2002; COPPLE et al., 2003; WANG et al., 2005). Entretanto, 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; HANUMEGOWDA et al., 2003; COPPLE et al., 2004; LEE et al., 2005; WANG et al., 2005). Tratando-se do metabolismo da monocrotalina especificamente, (TAYLOR et al., 1997), demonstraram que a mesma pode sofrer diferentes processos metabólicos no interior dos hepatócitos. FU et al (2002) e WANG et al (2005) consideraram que o metabolismo da MCT está diretamente relacionado a três processos principais:

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

Os pirróis ou derivados de dihidropirrolizínicos são considerados os principais responsáveis pela toxicidade dos APs (MATTOCKS, 1968). A metabolização dos APs para formar compostos pirrólicos é na maioria das vezes catalizada pelo sistema P450, especificamente através das isoformas CYP3A e CYP3B6 monooxigenases (YAN et al., 1995; SCHULTZE et al., 1996; TAYLOR et al., 1997; FU et al., 2002; COPPLE et al., 2003; COPPLE et al., 2004; LEE et al., 2005; WANG et al., 2005). Os derivados pirrólicos altamente reativos ligam-se rapidamente aos componentes teciduais e, acredita-se que sejam responsáveis pelas injúrias celulares

que ocorrem (MATTOCKS, 1968 ; BURROWS, 1991). Alguns destes metabólitos reativos são suficientemente estáveis, tendo a capacidade de sair das células hepáticas, através dos vasos sinusóides, e reagirem e causarem danos a tecidos extra-hepáticos, como os pulmões (MATTOCKS, 1986 ; BURROWS, 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 (MATTOCKS & JUKES, 1990 ; BURROWS, 1991), durante o transporte pela vasculatura pulmonar, onde irão promover doença pulmonar por mecanismo pouco caracterizado. 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 acídicas, 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). Posteriormente, a MCTP pode ser hidrolisada, formando composto denominado 6,7-dihidro-7-hidroxi-1-hidroximetil-5H-pirrolizina (DHP) que é solúvel em água e mais estável que a MCTP em sistemas aquosos sendo, portanto, excretado na urina (MATTOCKS, 1968; SWICK, 1984; FU et al., 2002). Além disso, esses compostos altamente reativos, podem ligar-se covalentemente ao DNA ou às enzimas hepáticas (MATTOCKS, 1968; SWICK, 1984), causando, concomitantemente, danos hepáticos como edema e necrose centrolobular, 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).

Geralmente, a conjugação com a glutatona (GSH) é considerada o principal processo de detoxificação através do qual xenobióticos e outros compostos são eliminados. Porém, a conjugação direta da GSH com muitos xenobióticos pode formar produtos tóxicos. Conjugados GSH podem, espontaneamente, converterem-se em compostos tóxicos ou requererem a metabolização por enzimas para liberação de compostos tóxicos. Como exemplo, temos o composto GSH-DHP (7-glutationilhidroretronecina), resultado da conjugação da MCTP com a GSH, que ao

invés de ser excretado, promove pneumotoxicidade quando administrado por via intravenosa ou subcutânea (HUXTABLE et al., 1990 ; TAYLOR et al., 1997).

Para COPPLE et al. (2002) a MCT produz hepatotoxicidade, pneumotoxicidade e hipertensão pulmonar crônica sendo a monocrotalina pirrol (MCTP), também denominada dehidromonocrotalina, o metabólito responsável pela toxidez da monocrotalina *in vivo*. A monocrotalina, no fígado, produz necrose das células parenquimais centro-lobulares, danos às células endoteliais das vênulas centrais e dos sinusóides, congestão e dilatação dos sinusóides e hemorragia. Um dos danos às células endoteliais vasculares é a ativação do sistema de coagulação. Durante a injúria vascular, as propriedades anticoagulantes e pro-fibrinolíticas das células endoteliais são perdidas, e a cascata de coagulação é iniciada através de fatores teciduais (COPPLE et al., 2003).

Além dos danos hepáticos, a monocrotalina, ativada metabolicamente no fígado à MCTP, quando transportada aos pulmões induz pneumotoxicidade, promovendo edema intersticial, inflamação, hemorragia e fibrose. Outras lesões aí observadas podem ser hidrotórax, edema e congestão pulmonar, epiteliação alveolar e arterite pulmonar (KAY & HEATH, 1966; McLEAN, 1970; HOOPER, 1978; YAN et al., 1995; SCHULTZE et al., 1996; TAYLOR et al., 1997; COPPLE et al., 2002; FU et al., 2002; COPPLE et al., 2003; HANUMEGOWDA et al., 2003; YEE et al., 2003; COPPLE et al., 2004; LEE et al., 2005; WANG et al., 2005). Segundo LEE et al. (2005) a indução de hipertensão pulmonar pela monocrotalina em ratos, deve-se ao fato da MCT aumentar consideravelmente a concentração de CTGF (fator de crescimento de tecidos conectivos) que é uma das moléculas chaves para progressão da fibrose tecidual. *In situ*, a expressão do CTGF encontra-se localizada nas células hipertrofiadas da musculatura lisa das artérias e arteríolas pulmonares, assim como, em macrófagos alveolares e pneumócitos resultando em obliteração de artérias, arteríolas e fibrose do septo alveolar.

Além dos pulmões, outros órgãos podem também, em menor extensão, ser lesados por APs. Assim, têm sido verificados danos renais, como glomerulonefrite e lesões tubulares, em animais intoxicados experimentalmente com *Crotalaria sp* ou por

seu principal alcalóide, a MCT (HAYASHI & LALICH, 1967; CARSTENS & ALLEN, 1970; FIGUEREDO et al., 1987). NOBRE et al. (1994) observou em equinos intoxicados com plantas do gênero *Crotalaria* nefrose tubular moderada, vacuolização de células tubulares e descamação de células epiteliais. CURRAN et al. (1996) encontrou glomerulonefrite proliferativa e megalocitose de células do epitélio dos túbulos proximais. NOBRE et al. (2004) encontrou lesões renais discretas nos animais espontaneamente intoxicados com *Crotalaria retusa*.

O quadro clínico-patológico apresentado pela maioria dos animais intoxicados naturalmente e experimentalmente é consistente com o de insuficiência hepática (NOBRE et al., 2004b). A insuficiência hepática ocorre quando 70% ou mais da capacidade funcional do fígado é perdida (TENNANT, 1997), o que ocorre quando há perda de 80% a 90% do parênquima, podendo ser visto, tanto em hepatopatias tóxicas agudas quanto crônicas (KELLY 1993).

Equinos com encefalopatia hepática apresentam notável disparidade entre a severidade dos sinais clínicos e a sutileza das alterações patológicas no cérebro, estando estas limitadas à presença de astrócitos isolados, em pares ou múltiplos, com núcleos vesiculares, aumentados e claros, na substância cinzenta, sendo referidos como astrócitos Alzheimer tipo II. São encontrados em maior número no córtex, núcleos basais e hipocampo, como satélites neuronais, no neuropilo ou isolados (SUMMERS et al., 1995). A disfunção neurológica é causada principalmente por hiperamonemia em razão do fígado lesado não metabolizar a amônia absorvida pelo intestino (KELLY, 1993). A amônia no sistema nervoso central é metabolizada pela glutamina dos astrócitos, a qual por si própria pode ser neurotóxica (SUMMERS et al., 1995).

Equinos intoxicados por *Crotalaria retusa* apresentam quadro clínico de anorexia, atordoamento, mal estado geral, irritabilidade, bocejos, espasmos musculares, incordenação, cabeça baixa, corrimento nasal bilateral, agressividade, andar a esmo e galope sem rumo (GARDINER et al., 1965, NOBRE et al., 2004).

Sintomatologia semelhante foi relatada na intoxicação de equinos por outras espécies de *crotalaria* (ARZT & MOUNT 1999, PITT & MCKENZIE, 2002). Alguns animais demonstram sinais de dor abdominal, como escavar o solo, e com apoio

constante dos membros pélvicos em obstáculos e arrastar de pinças. Existem casos em que o animal apresenta emagrecimento progressivo por 3-4 meses e outros em que o animal morre em 3-4 dias (NOBRE et al., 2004).

Os achados de necropsia são característicos de doença hepática crônica. O fígado encontra-se firme, aumentado de volume (GIBBONS, 1953; GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 1994; ARZT & MOUNT, 1999) e com aspecto mosqueado (ARZT & MOUNT, 1999). Nos pulmões as principais alterações observadas são edema e congestão pulmonar com áreas consolidadas no parênquima (GARDINER et al., 1965, NOBRE et al., 1994).

Histologicamente as principais alterações são observadas no fígado e incluem fibrose, hepatomegalocitose (GIBBONS et al., 1953, GARDINER et al., 1965, ARZT & MOUNT, 1999), necrose (GARDINER et al., 1965), vacuolização de hepatócitos (NOBRE et al., 1994), hemorragia (ARZT & MOUNT, 1999), e em alguns casos, proliferação de ductos biliares (GARDINER et al., 1965, ARZT & MOUNT, 1999). As lesões histológicas do fígado, encontradas em um estudo feito por DANTAS et al. (1999) consistem em megalocitose, caracterizada por aumento do tamanho do citoplasma e do núcleo, no qual, geralmente, encontra-se a cromatina condensada na periferia; fibrose difusa; e proliferação de células epiteliais dos ductos biliares. Pode ser observado em alguns animais nódulos regenerativos com hepatócitos aparentemente normais. Podem observar-se também, degeneração e necrose de hepatócitos, extensas áreas de fibrose no parênquima com ausência de hepatócitos e infiltração de células inflamatórias.

Os pulmões podem apresentar alveolite fibrosante difusa, com espessamento de septos interalveolares, edema e infiltrado inflamatório mononuclear e, principalmente, macrófagos espumosos (GARDINER et al., 1965, NOBRE et al., 1994).

O diagnóstico deve ser feito pelos dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões macroscópicas, confirmados mediante o estudo histológico das lesões hepáticas. Em equinos e em bovinos deve-se considerar no diagnóstico o fato de que as mortes podem ocorrer após um período prolongado de tempo, após os animais terem deixado de ingerir a planta sem apresentarem sinais clínicos. Em ovinos, a

doença ocorre na forma aguda. A morte poderá ocorrer a partir de 12 horas de ingestão da planta contendo muitos frutos com sementes (DANTAS et al., 2004). Para o diagnóstico diferencial, ficar atento as diversas doenças que causam sinais nervosos, diarreia, emagrecimento progressivo, edemas ou ascite e fotossensibilização (RIET-CORREA et al., 1993).

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 (COPPLE et al., 2003). Nesse contexto, a determinação da função hepática torna-se importante e segundo TENNANT (1997), deve ser realizada através da dosagem das enzimas AST, GGT e FA, que indicam a presença de lesões hepáticas agudas ou crônicas, sendo que o aumento nos níveis de GGT indicam lesões muito antigas nos ductos biliares (UNDERWOOD & SUTTLE, 2001). Em um estudo para avaliar testes bioquímicos como indicadores de doença hepática subclínica em equinos expostos a toxicose por AP, verificou-se que a atividade da gama glutamiltransferase (GGT) no soro é um teste eficiente para caracterizar a doença subclínica nos equinos. A elevação dos níveis de GGT no soro sanguíneo tem um alto grau de especificidade para danos hepáticos. Em alguns casos a GGT pode apresentar queda e retornar a valores de antes da exposição do animal aos AP (CRAIG et al. 1991). Esta queda foi interpretada por LESSARD et al. (1986) como um bom indicador no prognóstico. A GGT normalmente está limitada ao reticulo endoplasmático liso, onde o sistema de oxidase mista é ativo. Os AP são ativados por este sistema, onde causam danos e ocorre a liberação da GGT no soro (CURRAN et al., 1996).

É importante citar que apesar de ser considerado um bom teste para avaliar a lesão hepática induzida por AP, nem todos os animais que apresentam aumento de GGT desenvolvem sinais clínicos da doença (GILES, 1983). Segundo CRAIG et al. (1991) é interessante monitorar os animais sobreviventes a intoxicação por AP com testes enzimáticos. A fosfatase alcalina (FA), GGT e AST também foram analisadas nos equinos com intoxicação por *Crotalaria retusa* no semi-árido. Nos animais que foram dosados houve um aumento marcante da mesma (NOBRE et al., 2004b). A FA, apesar

de não ser hepato-específica, aumenta nos casos de danos hepáticos em decorrência de sua liberação na superfície sinusoidal dos hepatócitos, bem como na regurgitação das iso-enzimas biliares nos casos de colestase. Nas toxicoses por AP ocorrem ambas situações (CRAIG et al., 1991).

Outra alternativa para diagnóstico e acompanhamento da intoxicação por *C. spectabilis* pode ser realizada através da técnica de biópsia hepática percutânea com agulha cortante tipo tru-cut®. A biópsia hepática pode ser fonte valiosa de informações quanto aos diversos parâmetros relacionados a função hepática em animais, bem como forma auxiliar de diversas lesões que acometem o fígado (MEDEIROS et al., 2002). Além disso, a biópsia hepática permite diagnosticar lesões antes que os sinais clínicos tornem-se aparentes, diminuindo as perdas econômicas ou mortalidade dos animais afetados (DRIEMEIER, 1990). Segundo CRAIG et al. (1991), quando for observado aumento nas enzimas, principalmente GGT, deve-se fazer biópsia hepática para verificar o grau das lesões hepáticas.

Não existe tratamento que possibilite a recuperação dos animais com sinais clínicos da doença. Deve-se evitar o pastejo dos animais, principalmente equinos, nas áreas mais infestadas pela planta ou eliminá-las com uso de herbicidas ou pela eliminação manual (RIET-CORREA et al. 1993).

2. JUSTIFICATIVA

Vários são os estudos verificando a toxicidade das espécies de crotalárias para aves e animais domésticos (WEBB, 1948; SIMPSON et al, 1963; CLARKE & CLARKE, 1967; VENDECOURT & TRUMP, 1969; JUBB & KENNEDY, 1970; SMITH et al., 1972; STEYN, 1974; HOOPER & SCANLAN, 1977; TOKARNIA & DOBEREINER, 1982; BURGUERA et al. 1983; ALFONSO et al, 1993; HATAYDE et al, 1997a; HATAYDE et al, 1997b; SOUZA et al, 1997; HATAYDE et al, 1998; HATAYDE et al, 2008; SOUZA et al, 1998), entretanto, faltam estudos experimentais que demonstrem os efeitos das sementes de *Crotalaria spectabilis* quando fornecidas para equinos no que tange as alterações clínico-patológicas e bioquímicas apresentadas pelos animais intoxicados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Por meio deste trabalho pretende-se verificar os efeitos da intoxicação experimental em equinos com sementes de *Crotalaria spectabilis* trituradas e misturadas à ração.

3.2 Objetivos específicos:

- a- Avaliar clinicamente os animais durante o período de intoxicação e o de tratamento;
- b- Obter o perfil hematológico dos animais intoxicados por meio de hemograma e leucograma;
- c- Verificar a função hepática dos animais intoxicados por meio da dosagem das enzimas hepáticas, AST, GGT e fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina;
- d- Verificar as alterações microscópicas hepáticas semanalmente através da técnica de biópsia hepática transtorácica percutânea;
- e- Acompanhar a função renal destes animais por meio da dosagem de creatinina sérica;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e instalações

Foram utilizados 04 equinos, sem raça definida (SRD), hípidos, com idade aproximada de 10 anos, peso entre 330 kg e 350kg, alojados individualmente em baias equipadas com comedouros e bebedouros, situados em área coberta, junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP/ Jaboticabal.

Os animais receberam durante a realização do experimento dieta composta de feno de capim, água *ad libitum* e ração 12% peletizada (1kg/dia). Após um período de adaptação de 15 dias, os animais receberam sementes de *Crotalaria spectabilis* trituradas e incorporadas à ração nas seguintes proporções:

- Animal 1 (macho, 330kg) - 0,4%;
- Animal 2 (fêmea, 340kg) - 0,6%;
- Animal 3 (macho, 335kg) - 0,8%;
- Animal 4 (macho, 350kg) - 1,0%.

O controle corresponderá aos índices basais, de cada animal, antes do início do fornecimento das sementes de *C. spectabilis*.

4.2 Acompanhamento da indução de intoxicação por *Crotalaria spectabilis*.

Os animais receberam a ração contendo sementes trituradas de *C. spectabilis* durante três semanas. Semanalmente foram colhidas amostras de sangue e fragmentos do fígado, e, diariamente realizados exame clínico destes animais. Após um período de três semanas, os animais que manifestaram sinais clínicos de intoxicação, ou que apresentaram alterações histológicas e laboratoriais, passaram por um tratamento, com a tentativa de reestabelecer a função hepática. Para isso, foi realizada terapia de suporte que incluiu o fornecimento de solução oral eletrolítica e hepato-protetor.

4.3 Colheita de material biológico

4.3.1 Amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas das veias jugulares externas com agulhas 40x12. Estas amostras foram armazenadas em tubos esterilizados e siliconizados vacutainer®, devidamente identificados contendo em seu interior o anticoagulante EDTA (ácido dietileno diamino tetracético) e sem anticoagulantes, para obtenção de sangue total e soro respectivamente.

As amostras com anticoagulante foram homogeneizadas e prontamente refrigeradas, enquanto o sangue sem anticoagulante foi mantido à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram conduzidas ao laboratório. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas por um período de 15 minutos a 5000G. Após este processo as alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos Eppendorfes® e armazenadas à temperatura de – 20 °C.

As amostras contendo EDTA foram utilizadas para realização do hemograma e esfregaço sangüíneo logo após a coleta. Outra amostra contendo o anticoagulante foi preparada para realização de microscopia eletrônica de varredura.

4.3.2 Amostras de Fígado

Semanalmente foram colhidos fragmentos de fígado através da técnica de biópsia percutânea com agulha cortante tipo tru-cut®, para acompanhamento da intoxicação por *Crotalaria spectabilis* por meio de exames histológicos.

Para realização desta técnica, os animais foram contidos em posição quadrupedal, e uma área de 20 cm de largura por 25 cm de comprimento foi delimitada sobre o 12° e o 14° espaços intercostais, na interseção de uma linha estabelecida desde a tuberosidade coxal até o ponto médio entre o cotovelo e a ponta da escápula (BARTON & MORRIS, 2000). Essa área foi submetida a limpeza, tricotomia, antisepsia com álcool iodado e anestesia local infiltrativa empregando 5ml de cloridrato de

lidocaína 2% sem vasoconstrictor. Utilizou-se uma pequena lâmina de bisturi para realizar a incisão da pele e introduziu-se uma agulha cortante tipo Tru-cut® 18G com uso de pistola automática, que perfura os músculos intercostais e alcança o fígado. A agulha foi direcionada na posição do cotovelo oposto e com auxílio de ultrassonografia foi determinado a profundidade necessária para penetração da agulha no parênquima hepático (NAVARRE & PUGH, 2005; MEDEIROS et al., 2002; SILVA et al., 1996). Foi colhido um fragmento de aproximadamente 2 cm de comprimento e armazenado em solução de formol tamponado a 10% para realização dos exames histológicos.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Amostras de sangue (soro e sangue total).

4.4.1.1 Hemograma e leucograma completos

A contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas, as determinações dos teores de hemoglobina, hematócrito, área corpuscular média (VGM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizados em contador automático (Celm CC-510.). As contagens diferenciais de glóbulos brancos foram feitas com auxílio de microscópio óptico comum, após coloração pelo corante de Rosenfeld (0,97 g de Giemsa em pó azur eosina-azul-de-metileno, Ecibra nº 0390; 0,53 g de May Grüwald eosina-azul de metileno, Ecibra nº 0747; 1000ml Metanol PA, Cinética cod. 109070).

4.4.1.2 Esfregaço sangüíneo

O esfregaço de sangue foi realizado estendendo-se uma pequena gota de sangue com EDTA, com o auxílio de um tubo de microhematócrito, sobre lâmina de vidro. Com o auxílio de uma segunda lâmina que faz com a primeira um ângulo de 45° foi estendida a gota (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1998).

Realizado o esfregaço, a lâmina foi corada com o corante de Wright, conforme a técnica descrita por GARCIA-NAVARRO & PACHALY (1998).

4.4.1.3 Avaliação das funções hepática e renal

A avaliação da função hepática foi realizada semanalmente por meio da determinação das enzimas hepáticas AST, GGT, FA, proteína total e albumina e, a função renal foi avaliada pela dosagem de creatinina, com a utilização de kits comerciais, conforme as instruções fornecidas pelo fabricante a partir do soro sangüíneo dos animais.

4.5 Exame histológico

4.5.1 Microscopia óptica

As amostras de fígado coletadas pelas biópsias percutâneas transtorácicas com agulha cortante, e acondicionadas em formol a 10% permaneceram neste fixador por 18 horas, permitindo a completa fixação do tecido hepático. Após este período foram realizadas a montagem e coloração das lâminas, com Hematoxilina- eosina (HE), para histologia, segundo a técnica descrita por LUNA (1968).

4.6 Procedimento pós – experimento

Ao final de cada biópsia de fígado, as feridas incisionais cutâneas realizadas no local da punção foram tratadas com pomada antibiótica e repelente ao redor. Todos os animais foram tratados com protetor hepático (1 aplicação intramuscular 1 vez ao dia durante 5 dias) ao final de 21 dias de experimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação clínica dos animais durante o período de intoxicação

Os quatro animais submetidos à experimentação não tiveram alterações importantes no exame físico. A Tabela 1 mostra as médias dos valores absolutos da frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura (T^oC) e avaliação da motilidade, mucosas e hidratação dos animais submetidos ao experimento durante os 21 dias.

Tabela 1. Média dos valores absolutos de frequência cardíaca (F.C.), frequência respiratória (F.R.), tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura (T^oC) e avaliação da motilidade, mucosas e hidratação dos animais 01, 02, 03 e 04 que foram submetidos à intoxicação por *Crotalaria spectabilis* durante 21 dias.

Animal	Valores						
	F.C.(bpm)	F.R.(mvm)	TPC(s)	T ^o (C)	Motilidade	Mucosas	Hidratação
1	40	23	2	37,5	++	Róseas	++
2	41	18	2	37,6	++	Róseas	++
3	49	18	2	37,9	++	Róseas	++
4	43	15	2	37,6	++	Róseas	++

As Figuras 2 e 3 mostram a variação dos valores absolutos de frequência cardíaca e respiratória dos animais submetidos à intoxicação durante os 21 dias de experimento.

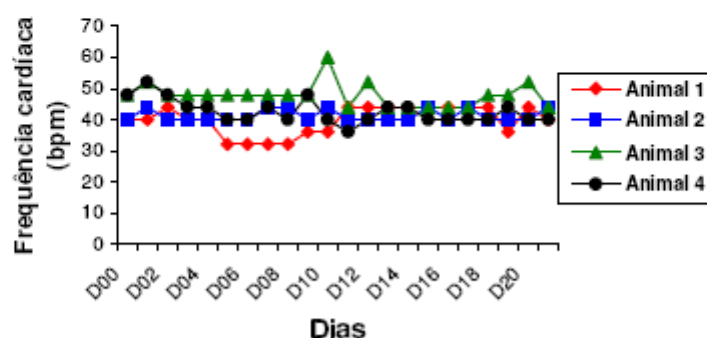


Figura 2. Variação dos valores absolutos de frequência cardíaca dos animais 1,2,3 e 4 intoxicados por sementes de *Crotalaria spectabilis*.

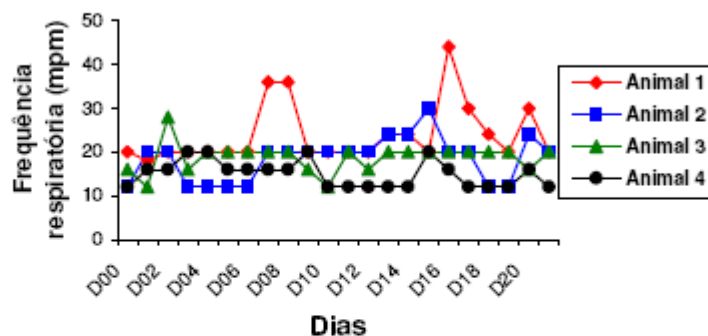


Figura 3. Variação dos valores absolutos da frequência respiratória dos animais 1,2,3 e 4 intoxicados por sementes de *Crotalaria spectabilis*.

Não foram observadas mudanças de comportamento e nenhuma anormalidade neurológica. O peso dos animais não sofreu modificação ao final dos 21 dias de experimento. Entretanto, REED & BAYLY (2000) relata que os sinais mais frequentemente notados são perda de peso com semanas a meses de duração e anormalidades comportamentais.

O animal 3 apresentou episódio de febre que durou apenas um dia, como mostra a Figura 4.

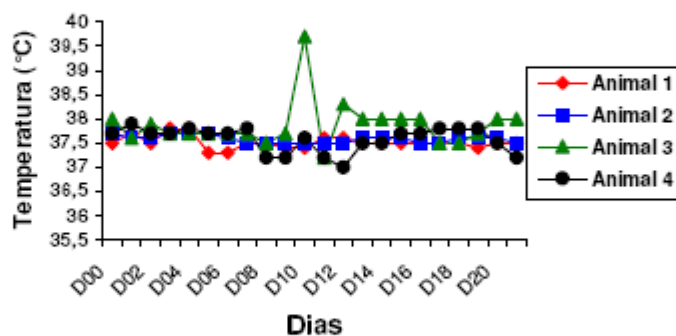


Figura 4. Variação dos valores absolutos de temperatura dos animais 1,2,3 e 4 intoxicados por sementes de *Crotalaria spectabilis*. Notar o pico febril do animal 3 no 10º dia.

O animal 3 também apresentou apatia no 11º dia que se acentuou no dia seguinte. No 13º dia, tinha sialorréia e fezes amolecidas. Estes sinais persistiram por

mais três dias quando o animal voltou a ficar mais alerta, sem salivação e as fezes voltaram a consistência normal, fatos que concordam com os achados de REED & BAYLY (2000). Na última semana de experimento, o animal passou a ter corrimento nasal unilateral (narina esquerda) levemente mucosa, como mostra a Figura 5, também observado por NOBRE et al. (2004) em eqüinos intoxicados com *C. retusa*.



Figura 5. Corrimento nasal (seta) do animal 3 observado na última semana de experimento. Notar a consistência mucosa.

Com exceção do animal 1, todos os outros animais tiveram alteração de pele, localizadas na região da face dos mesmos, caracterizada por áreas de alopecias, diferente dos achados de RIET-CORREA citado na pesquisa de OLIVEIRA (2008) onde encontrou respostas de fotossensibilização, como mostra a Figura 6.



Figura 6: Eqüino com fotossensibilização (Cortesia do professor Franklin Riet-Correa ao trabalho de OLIVEIRA (2008))

O início destas lesões ocorreu com 11 dias no animal 2, 12 dias no animal 3 e 10 dias no animal 4. O animal 3, além da alopecia apresentou prurido, como mostram as Figuras 7, 8, 9 e 10. O animal coçava o focinho na porta da baia e nos mourões quando era solto no piquete. Observou-se que o prurido se intensificava quando era exposto ao sol. As lesões de pele deste animal foram as mais acentuadas entre os animais que tiveram lesão de pele.

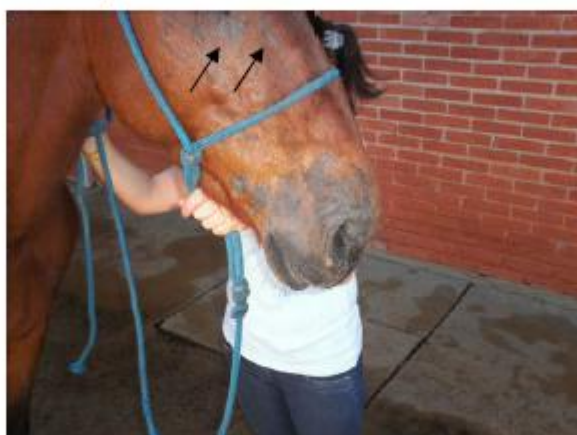


Figura 7. Animal 3 intoxicado por *Crotalaria spectabilis* com alopecia na região do focinho. As setas mostram pequenas áreas de alopecia na região maxilar.



Figura 8. Animal 3 intoxicado por *Crotalaria spectabilis* com alopecia na região do focinho. A seta mostra lesão devido ao prurido.



Figura 9. Animal 3 intoxicado por *Crotalaria spectabilis* com alopecia no lado esquerdo da região do focinho. As setas mostram lesão devido ao prurido.



Figura 10. Animal 3 intoxicado por *Crotalaria spectabilis* com alopecia no lado direito da região do focinho. A seta mostra lesão devido ao prurido.

No exame clínico com o uso de ultrassonografia, os animais apresentaram aumento de volume hepático duas semanas após o início da intoxicação, com exceção do animal 2 que apresentou aumento de volume hepático uma semana após o início do experimento, e esse aumento de volume manteve-se até o final da intoxicação.

5.2. Hemograma e Leucograma

O perfil hematológico dos animais intoxicados analisado por meio do hemograma e leucograma revelou alterações que não modificaram visivelmente o estado hídrico dos animais. As Tabelas 2 e 3 mostram as médias dos valores absolutos dos elementos que compõem o hemograma e o leucograma dos animais submetidos ao experimento durante os 21 dias.