



unopar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE
RUMINANTES**

MARCELA LUCAS DE LIMA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE NOVILHAS
NELORES SUBMETIDAS À INTOXICAÇÃO POR *Pteridium
arachnoideum* APÓS INGESTÃO DE DOSES SUBTÓXICAS**

ARAPONGAS

2019

MARCELA LUCAS DE LIMA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE NOVILHAS
NELORES SUBMETIDAS À INTOXICAÇÃO POR *Pteridium
arachnoideum* APÓS INGESTÃO DE DOSES SUBTÓXICAS**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho

ARAPONGAS – PARANÁ

2019

Ficha catalográfica elaborada, com dados fornecidos pelo (a) autor (a)

Biblioteca UNOPAR / Arapongas - Maria Luci Juliani Grano CRB – 9/776

LIMA, Marcela Lucas de

Avaliação clínica e laboratorial de novilhas Nelores submetidas à intoxicação por *Pteridium Arachnoideum* após ingestão de doses Subtóxicas. Arapongas: UNOPAR, 2019. 38p.

Orientador: Cunha Filho, Luiz Fernando Coelho da

Dissertação (Mestrado) UNOPAR - Medicina Veterinária - Saúde e Produção de Ruminantes, 2019.

1. Medicina Veterinária - Dissertação de mestrado - Unopar. 2. Saúde e Produção de Ruminantes. 3. Toxicologia animal. 4. Bovinos – intoxicação aguda 5. Bovinos - *Hematúria enzoótica bovina* (HEB). 6. *Pteridium arachnoideum* - manifestações clínicas. 7. Samambaia do campo (*Pteridium arachnoideum*) – plantas tóxicas. I. Cunha Filho, Luiz Fernando II. Título.

CDU: 619:636

Maria Luci Juliani Grano: CRB – 9/776

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA PRÉ-DISPOSIÇÃO DE VACAS GESTANTES À
INTOXICAÇÃO POR *PTERIDIUM ARACHNOIDEUM* APÓS INGESTÃO DE
DOSES SUBTÓXICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes - área de concentração Saúde de Ruminantes, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção Animal

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho
Universidade Norte do Paraná-UNOPAR

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Queiroz
Universidade Norte do Paraná-UNOPAR

Prof. Dr. Wilmar Sachetin Marçal
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Arapongas, 07 de março de 2019.

*Dedico aos meu pais Antonio e Marilena e,
a todos que me acompanharam nessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Há exatos dois anos, pude ter a oportunidade de ingressar no mestrado e desfrutar de boas experiências, conhecimento e, conhecer pessoas preciosas que sem o apoio e ajuda não seria possível chegar a esse momento.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado me guiando, mostrando os caminhos que devo seguir e sempre colocando nele as pessoas corretas.

Aos meus pais, Antonio Theodoro de Lima e Marilena Lucas de Lima, por sempre me apoiarem nesse sonho de infância que é a Medicina Veterinária e, nesses dois anos não foram diferentes, continuaram a me apoiar incondicionalmente, independentemente das adversidades, portanto, a vocês entrego o meu sincero obrigada e o meu amor eterno.

Ao meu orientador Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho, pelas oportunidades, paciência, apoio e incentivo durante esses dois anos. Muito obrigada também pelas conversas e broncas quando foram necessárias.

À todos os alunos da graduação, principalmente aos que participam do Grupo de Estudos em Ruminantes (GER) que estiveram ao meu lado no início da colheita da samambaia, mas principalmente ao José Victor Pronievicz Barreto pelas ajudas incontáveis, conversas, desabafos, viagens do projeto, conselhos e apoio quando precisei. Você, é um amigo que levarei para a vida.

À Michele Monteiro Sudak, que também se manteve firme e forte durante todo o processo do experimento. A você devo toda a minha gratidão, pois sem a sua ajuda jamais teria conseguido, obrigada pelas conversas, pelo companheirismo e dedicação.

À Professora Silvana Maria de Oliveira Santin do departamento de Química na Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a sua aluna de doutorado Mirelli Bianchin por realizarem o isolamento e identificação do princípio tóxico da samambaia.

Ao seu Manoel (Mané) que se prontificou a cuidar das novilhas diariamente durante todo o experimento.

À todo corpo docente da Universidade Norte do Paraná, em especial a Prof^a Fabíola Cristine de Almeida Rêgo Grecco por todo apoio nesses dois anos.

À Prof^a. Elis Lorenzetti, por ter disposto de seu tempo para realizar os exames de PCR.

À vocês minha eterna gratidão.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”

John F. Kennedy

LIMA, Marcela Lucas de: **Avaliação clínica e laboratorial de novilhas Nelores submetidas à intoxicação por *Pteridium Arachnoideum* após ingestão de doses Subtóxicas.** 2019. 38 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes – área de concentração: Saúde de Ruminantes), Universidade Norte do Paraná. Arapongas. 2019.

RESUMO

Pteridium arachnoideum, popularmente nominada de samambaia, é conhecida também como pluma e samambaia do campo e está disseminada na maioria das propriedades rurais, é considerada uma planta tóxica muito importante. As doenças relatadas em rebanhos de bovinos em áreas com a presença da samambaia incluem a intoxicação aguda (diátese hemorrágica) e crônica (carcinomas das vias digestórias superiores e hematúria enzoótica bovina – HEB). Dentre as três formas clínicas acima descritas, a HEB é a de maior incidência. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum* nas manifestações clínicas, e laboratoriais de novilhas nelores suplementadas a pasto. Vinte e duas fêmeas foram selecionadas e separadas em três grupos: 10 gestantes, 10 não gestantes, e 2 não gestantes em lactação. Os animais foram confinados em um piquete de 0,5 hectares com grama estrela (*Cinodon dactylon*) contendo cochos coletivos em uma propriedade localizada na cidade de Regente Feijó- SP. Dieta: água *ad libitum*; suplemento concentrado (0,3%/PV/cab/dia) comercial e sal mineralizado com 40g de fósforo. Ofertada uma vez ao dia, durante os 120 dias de tratamento, adicionada de *P. arachnoideum* na dose de 4 g/kg PV. Os três grupos foram monitorados por meio de hemograma e urinálise a cada 15 dias, durante 120 dias. A partir dos 60 dias de experimento foi possível observar presença de microhematúria nos exames urinários.

Palavras chave: Samambaia, planta tóxica, hematúria enzoótica bovina.

LIMA, Marcela Lucas de: **Clinical and Laboratorial Evaluation of Nelores cows to Pteridium Arachnoideum Intoxication after Intake of Subtoxic Doses.** 38p. Master's Dissertation in Health and Ruminant Production (Master's Degree in Health and Ruminant Production), University North of Paraná. Arapongas, 2019.

ABSTRACT

Pteridium arachnoideum, popularly known as fern, is also known as feather and fern of the field and is widespread in most rural properties, is considered a very important toxic plant. Diseases reported in cattle herds in areas with fern include acute intoxication (haemorrhagic diathesis) and chronic intoxication (upper digestive tract carcinomas and enzootic bovine hematuria - HEB). Among the three clinical forms described above, HEB is the one with the highest incidence. The objective of this work was to verify the effect of the ingestion of subtoxic doses of *Pteridium arachnoideum* in the clinical manifestations, and laboratory of nellor heifers supplemented to pasture. Twenty-two females were selected and separated into three groups: 10 pregnant women, 10 non-pregnant women, and 2 non-pregnant women. The animals were confined in a 0.5-hectare picket with star grass (*Cinodon dactylon*) containing collective cocks in a property located in the city of Regente Feijó- SP. Diet: water ad libitum; concentrate supplement (0.3% / PV / hr / day) and mineralized salt with 40g of phosphorus. Offered once daily during the 120 days of treatment, added *P. arachnoideum* at the dose of 4 g / kg PV. The three groups were monitored by means of hemogram and urinalysis every 15 days for 120 days. From the 60 days of the experiment it was possible to observe the presence of microhematuria in the urinary exams.

Key words: Fern, toxic plant, bovine enzootic hematuria.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** Resultados das contagens de hemácias na urina, pela câmara de Neubauer. Evidenciando microhematúria dos 60 aos 120 dias de experimento.....33
- Tabela 2** Valores hematológicos de Novilhas Nelore submetidas ao tratamento com doses subtóxicas de *P. arachnoideum*..... 34
- Tabela 3** Relação de ganho de peso e presença de microhematúria em novilhas submetidas a dieta contendo doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum* em um período de 120 dias..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPV – Papilomavírus Bovino
CVDS – Carcinoma das vias digestórias superiores
GMD – Ganho médio diário
HEB – Hematúria Enzoótica Bovina
PCR - Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 Introdução | 12 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1. <i>Pteridium arachnoideum</i> : Taxonomia..... | 14 |
| 2.2. Aspectos gerais | 14 |
| 2.3. Ocorrência do <i>Pteridium arachnoideum</i> no Brasil..... | 15 |
| 2.4. Princípios Tóxicos..... | 15 |
| 2.5. Intoxicação animal..... | 16 |
| 2.6. Manifestações clínicas da intoxicação por <i>Pteridium arachnoideum</i> em bovinos...17 | |
| 2.6.1. Intoxicação Natural..... | 17 |
| 2.6.2. Diátese Hemorrágica..... | 17 |
| 2.6.3. Carcinoma das Vias Digestivas Superiores..... | 18 |
| 2.6.3.1 Papilomavírus bovino..... | 19 |
| 2.6.4 Hematúria Enzoótica Bovina..... | 20 |
| 2.6.5 Intoxicação experimental..... | 21 |
| 3. REFERÊNCIAS..... | 22 |
| 4. OBJETIVO..... | 27 |
| 3.1 Objetivo geral | 27 |
| 3.2. Objetivos específicos | 27 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Avaliação clínica e laboratorial de vacas nelores à intoxicação por <i>Pteridium arachnoideum</i> após Ingestão de doses Subtóxicas..... | 28 |
| Resumo..... | 28 |
| Abstract | 29 |
| Introdução | 30 |
| Material e Métodos | 31 |
| Resultados e Discussão | 32 |
| Conclusão | 35 |
| Referências | 36 |

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Pteridium arachnoideum, popularmente nominada de samambaia, é conhecida também como pluma, feto e samambaia do campo (BOABAID., 2015). Ela está disseminada na maioria das propriedades rurais sendo considerada uma planta tóxica muito importante. Não apenas pelos seus efeitos carcinogênicos, mas também pelos malefícios que causa à pecuária extensiva, por ser considerada uma planta com grande capacidade de sobrevivência no meio ambiente e uma excelente produção de matéria verde, podendo causar grandes impactos na cadeia produtiva dos alimentos de origem animal. A presença da samambaia acarreta em prejuízos aos pecuaristas, pois além de causar a degradação das pastagens, as enfermidades causadas nos animais que a ingerem acabam sendo descartados precocemente, ocorrendo perda na produção leiteira e no valor da carne e, gastos em assistência veterinária (ALVARENGA et al.,2015).

Dentre os princípios tóxicos presentes no *Pteridium arachnoideum* se destaca o ptaquilosídeo, que é carcinogênico (HOJO-SOUZA, CARNEIRO, SANTOS., 2010). A ocorrência de neoplasias está diretamente relacionada à concentração desse composto na planta, sendo vários os fatores que influenciam na concentração do princípio na planta. Portanto, além de tóxica, a samambaia prejudica a quantidade e qualidade da terra disponível para pastoreio e conservação. O’Driscoll et al. (2016) citam que alguns estudos têm investigado medidas de controle da samambaia e o impacto destas concentrações do ptaquilosídeo na planta, observando que as samambaias que tinham as frondes cortadas ou submetidas a pastejo continham níveis mais elevados do princípio tóxico, se comparadas as que não tinham sido manejadas.

As doenças relatadas em rebanhos de bovinos em áreas com a presença da samambaia incluem a intoxicação aguda (diátese hemorrágica) e crônica (carcinomas das vias digestórias superiores e hematúria enzoótica bovina – HEB) (O’DRISCOLL et al., 2016). Dentre as três formas clínicas acima descritas, a HEB é a de maior incidência, caracterizada pela formação de tumores na bexiga, induzidas pela ação do ptaquilosídeo (POTTER; BAIRD, 2000).

As lesões neoplásicas na bexiga e no trato digestório superior de bovinos podem estar associadas com a infecção pelo papilomavírus bovino (BPV) em associação com cofatores oncogênicos presentes na samambaia (*Pteridium arachnoudeum*) (CAMPO et al.,1992; BORZACCHIELLO et al.,2001). BPV é um vírus DNA epiteliotrópico, capaz de infectar células basais induzindo-as à formação de lesões tumorais, conhecidas popularmente como papiloma ou verrugas, em epitélio cutâneo e mucoso. As lesões costumam ser benignas e com tendência a regressão, porém podem se transformar em tumores malignos (CLAUS., 2007).

O Ptaquilosídeo, já foi isolado de leite de vacas que consumiam a planta, demonstrando que aproximadamente 8% do total de ptaquilosídeo ingerido pela vaca é excretado no leite (ALONSO-AMELOT et al., 1999). FRANCESCO et al (2011) demonstraram que em mais de 30% das amostras de leite colhidas de vacas, éguas, ovelhas e cabras apresentaram a toxina. Por meio do oferecimento de ração com samambaia, extrato aquoso do broto, leite de vacas que consumiam samambaia ou Ptaquilosídeo purificado, diferentes tipos de neoplasias foram induzidos em ratos (CRUZ et al., 2005).

Em um amplo levantamento em municípios paranaenses, detentores da samambaia em suas pastagens, os autores correlacionaram a existência da planta a manifestação natural de Hematúria Enzoótica dos Bovinos para, num momento futuro e oportuno, conseguirem sensibilizar os produtores rurais para o controle da planta, eliminação da enfermidade e maior segurança a saúde pública, consumidora dos subprodutos de origem animal, como carne e leite (SILVA et al., 2016).

Shahin et al. (1999) demonstraram que o leite de vacas que consomem samambaia contém quantidades significativas de ptaquilosídeo e isto representa um risco para saúde pública, em virtude de suas propriedades cancerígenas, mostrando que a presença do princípio no leite de animais é um risco em potencial para a saúde, representando então uma preocupação com a segurança alimentar (VIRGILIO et al., 2015)

Tendo em vista que grande parte da população consome leite e seus derivados; que mesmo após a fervura o ptaquilosídeo conserva o seu potencial carcinogênico (ALVARENGA., 2015); e que o consumo de broto, leite com ptaquilosídeo, resíduos do composto na carne e água potável são de importância para a saúde pública e estão sendo investigados (O' DRISCOLL et al., 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pteridium arachnoideum*: Taxonomia

Após a realização de alguns estudos moleculares foram propostas mudanças na taxonomia do gênero *Pteridium* (HOJO-SOUZA, CARNEIRO, SANTOS, 2010). Anteriormente pertencente à família *Polypodiaceae*, a espécie *Pteridium aquilinum*, apresentava 2 subespécies e diversas variedades (ALONSO-AMELOT, 1999), passou então, a pertencer a família *Dennstaetiaceae* e, algumas de suas variedades foram elevadas à condição de espécies, sendo então, denominadas *P. caudatum* e *P. arachnoideum* (THOMSON.,2012).

2.2. Aspectos gerais

Pteridium arachnoideum, popularmente conhecida como samambaia, é considerada uma das cinco plantas mais bem-sucedidas do reino vegetal (CRUZ; BRACARENSE, 2004). São pteridófitas, isto é, são vasculares, perenes, rizomatozas, com folhas grandes que formam touceiras e produzem grande quantidade de biomassa e não produzem sementes (GAVA, 1994; RIBEIRO et al., 2013).

Devido aos seus rizomas extensos e rizoides profundamente inseridos no solo possuem altas taxas de rebrota, o que confere a elas uma grande capacidade de se adaptarem às condições adversas, como por exemplo, queimadas e geadas. Com isso, se espalham rapidamente em pastagens, áreas marginais e degradadas e são favorecidas pelo fogo e pela acidez do solo, tornando difícil o seu controle (DURAO et al., 1995; FURLAN et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013). Possuem capacidade de sequestrar nutrientes do solo a longas distâncias, excluindo as espécies competitivas, além de se reproduzir por meio de esporos que são carregados pelo vento (ALONSO-AMELOT; AVERDANO, 2002).

Tem a característica de crescerem próximos a bordos de mata e capões e, em altitudes e latitudes diversas. Porém, estudos comprovam que em altitudes de 1400 a 1800m a planta apresenta maior concentração do princípio tóxico (VILLALOBOS – SALAZAR et al., 1999), sendo maior ainda a concentração desse princípio no broto durante a primavera (CRUZ

et al., 2005). Suas frondes crescem de raízes subterrâneas, normalmente em meados de maio, atingindo a maturidade de julho ao início de setembro (O' DRISCOLL et al., 2016).

2.3 Ocorrência do *Pteridium arachnoideum* no Brasil

O *Pteridium arachnoideum* está presente em todos os continentes, exceto na Antártida (FENWICK, 1988), mas apenas duas espécies são encontradas no Brasil, *caudatum* e *arachnoideum*, sendo a última de maior prevalência, e identificada em praticamente todos os estados (TOKARNIA et al., 2012).

2.4 Princípios Tóxicos

O *Pteridium arachnoideum* e sua ação tóxica vem sendo analisada desde a década de 70 por meio da indução de lesões com várias substâncias isoladas da planta, tais como: o ácido chiquímico (EVANS, 1979; HIRONO; FUSHIMI; MATSUBARA, 1977), a quercitina (PAMUCKU et al., 1980a), os taninos (PAMUCKU et al., 1980b), tiaminase (MARTINI-SANTOS, 2010) e o ptaquilosídeo (GIL DA COSTA et al., 2012; HIRONO et al., 1987; SHAHIN et al., 1988) que é considerado o principal agente tóxico (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; HOJO SOUSA; CARNEIRO; SANTOS, 2010; RASMUSSEM, 2003).

O ptaquilosídeo é um dos compostos presentes no *Pteridium arachnoideum* que foi isolado pela primeira vez por Niwa et al. (1983) (CRUZ; BRACARENCE, 2004) e, identificado como um glicosídeo norsesquiterpeno, composto amorfo, incolor, de fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_8$. Este composto é carcinogênico, mutagênico e clastogênicos, isto é, que tem capacidade de promover quebras cromossômicas (O'DRISCOLL et al., 2016). É encontrado em todas as partes da planta, porém tem uma maior concentração no ápice do broto, que é a parte aérea da planta, consumida pelos bovinos. A ocorrência de neoplasias está diretamente relacionada a concentração desse princípio na planta, e os fatores tais como: clima, solo e altitude interferem nessa concentração (ALONSO – AMELOT, 1999).

Há alguns fatores que interfiram na toxicidade da samambaia, e que provavelmente acarretam na variação da concentração do ptaquilosídeo na planta, como por exemplo idade da planta (TOKARNIA et al., 2012), tipo de solo, clima, geografia (ALONSO-AMELOT, 1999) e luminosidade (SMITH; LAUREN; PRAKASH, 1999).

O Ptaquilosídeo se mantém estável por mais de uma semana em temperatura ambiente e por mais de seis meses a temperaturas entre -20 e 0°C (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007), porém se torna instável em soluções aquosas na presença de base, ácido ou

calor. Em condições ácidas a pterosina B é produzida rapidamente e, em condições alcalinas é formada a dienona instável, que além de ser considerada o verdadeiro composto indutor da carcinogênese e, também tem a capacidade de promover mutações e, pode sofrer aromatização e liberar a pterosina B (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007).

O princípio tóxico tem a capacidade de atravessar a membrana celular e, associar-se às proteínas com terminais amino expostos no núcleo, como o DNA (ALONSO-AMELOT, AVEDANÒ, 2002) possuindo então, a capacidade de causar alterações permanentes em genes que codificam a ativação de outros genes, ou que possuem função reguladora, como a regulação do apoptose e a supressão de tumores (SANTOS; BRASILEIRO FILHO; SILVA, 1992), propiciando a formação e a multiplicação de tecido tumoral (CRUZ; BRACARENSE, 2004).

2.5 Intoxicação animal

Algumas condições são relatadas para que ocorra o consumo da samambaia pelos animais, já que são consideradas não palatáveis (MARÇAL, 1990). A ingestão está relacionada a falta (fome) ou diminuição na qualidade do alimento dos animais criados extensivamente.

Os brotos e as partes jovens da planta são consumidos pelos animais nas estações secas, após queimadas, geadas e, roçadas (MARÇAL et al., 2001) e em condições de superlotação do pasto (MARÇAL, 1990). Há também as condições de deficiência de fibra na dieta, contaminação do feno com a samambaia e utilização da planta como cama (TOKARNIA et al., 2012).

Os surtos por intoxicação aguda, geralmente são de forma esporádica, com baixa taxa de morbidade, alta de mortalidade e alta de letalidade (ANJOS et al., 2008), podendo alcançar grandes proporções quando há presença de fatores, já mencionados anteriormente, tornando as pastagens muito baixas ou escassas, favorecendo a procura pela samambaia, que se mantém viçosa (MARÇAL et al., 2002) e com grande quantidade de massa verde (RIBEIRO et al., 2013).

2.6 Manifestações clínicas da intoxicação por *Pteridium arachnoideum* em bovinos

As manifestações clínicas da intoxicação pelo *Pteridium arachnoideum* varia conforme a quantidade da planta que foi ingerida, o tempo e a espécie animal acometida (TOKARNIA et al., 2012). A intoxicação pode se manifestar de forma aguda ou crônica, apresentando diferentes sinais clínicos.

2.6.1 Intoxicação Natural

A intoxicação natural em bovinos ocorre de três formas bem distintas: a diátese hemorrágica, hematúria enzoótica bovina e carcinomas do trato digestivo superior. Não havendo predisposição por raça e sexo.

2.6.2 Diátese Hemorrágica

A diátese hemorrágica, também conhecida como síndrome hemorrágica aguda em geral está associada ao consumo dos brotos, considerada a região mais tóxica da planta (TOKARNIA et al., 2012), com alto índice de letalidade, podendo acometer animais de todas as idades. No entanto, animais com até dois anos de idade são acometidos com mais frequência quando ingerem quantidades superiores a 10g/kg da planta diariamente durante semanas a poucos meses (TOKARNIA et al., 2000).

No estado do Paraná, já foram relatados surtos de intoxicação com morte de 25 bovinos no município de Reserva (MARÇAL et al., 2001) e, 14 bovinos da raça Aberdeen angus no município de Ortigueira (MARÇAL et al., 2002).

Os sinais clínicos geralmente iniciam três semanas após o início da ingestão, e até 8 semanas depois da última ingestão da planta (TOKARNIA et al., 2000; PEDROSA & BOHLAND, 2008). Os animais podem apresentar febre, salivação, hemorragias espontâneas por cavidades naturais, diarreia e/ou melena. Podem ser observadas úlceras naso-labiais, petéquias e equimoses nas mucosas e pele (TOKARNIA et al., 2000; ANJOS et al., 2008; PEDROSA & BOHLAND, 2008). É possível observar o quadro de hematidrose devido à trombocitopenia e a fragilidade capilar (MARÇAL, 2003), os animais vêm a óbito geralmente em um a três dias (RADOSTITS et al., 2002), perdurando por até 15 dias (PEDROSA & BOHLAND, 2008).

A medula óssea é afetada pelas toxinas da planta, ocorrendo diminuição da granulopoiese e trombopoiese, com redução das plaquetas circulantes e dos leucócitos. A série eritrocitária na medula é afetada somente nos estágios terminais (PEDROSA & BOHLAND, 2008). Em alguns casos pode ocorrer a liberação de histamina devido a lesão de mastócitos nos tecidos acarretando em fragilidade capilar, ulceração intestinal e edema de laringe (RADOSTITS et al., 2002).

Na necropsia, as hemorragias variam de petéquias a grandes extravasamentos, como hemoperitônio, hemotórax e hemopericárdio. Na mucosa do trato digestório pode-se observar necrose nas áreas hemorrágicas, com úlceras e presença de coágulos de sangue na luz intestinal (MARÇAL, 2003).

2.6.3 Carcinoma das vias digestórias superiores

Há uma alta incidência de bovinos acometidos por carcinomas epidermoides das vias digestórias superiores (CVDS), no Brasil, onde os pastos são intensamente invadidos pelo *Pteridium arachnoideum*. Raramente essas neoplasias são encontradas em animais que pastejam em áreas sem a planta (TOKARNIA et al., 2000).

A enfermidade tem evolução crônica, variando de 6 meses podendo chegar em até 2 ou 3 anos, sendo assim, geralmente os animais acometidos possuem uma idade mais avançada, 5 a 8 anos de idade (TOKARNIA et al., 2012), no entanto, os animais acometidos devem ingerir menos de 10g/kg de peso vivo por dia. Ao contrário do que ocorre na fase inicial da hematúria, a retirada dos animais acometidos dos locais invadidos pela samambaia parece não influenciar na evolução da doença (TOKARNIA et al., 2000).

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos acometidos por CVDS são de ordem mecânica (ingestão e ruminação dos alimentos) e estão associados aos locais em que as neoplasias se instalam (TOKARNIA et al., 2012), tais como: são a dificuldade de deglutição, ronqueira, regurgitação de alimentos, timpanismo crônico recidivante, tosse, dispnéia, corrimento nas narinas, dificuldade de mastigação e ruminação, diarreia e emagrecimento progressivo (TOKARNIA et al., 2012).

No exame macroscópico, há formação de neoplasias na base da língua, da faringe, do esôfago, cárdia e rúmen, que se infiltram nos tecidos adjacentes, possuem coloração amarelada ou acinzentada, frequentemente ulcerados, possuindo um material necrótico com odor fétido. Acredita-se que esses tumores sejam induzidos pela ação dos carcinógenos da

samambaia e/ou por meio da diminuição da resposta imunológica do animal frente aos vírus causadores de tumores (SOUTO et al., 2006).

2.6.3.1 Papilomavírus bovino

Os papilomavírus estão classificados na família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* e, constituem um grupo heterogêneo de vírus e diferentes genótipos são associados a diferentes tipos de lesões espécie-específicos e, frequentemente, sítio anatômico-específico (MAULDIN & PETERS-KENNEDY., 2016).

Na espécie bovina foram descritos treze *Papillomavirus* (BPV) como causa de papilomas (verrugas) e/ou fibropapilomas (figura 1), onde ocorre a proliferação de tecido fibroso coberto por epitélio hiperplásico e hiperkeratótico (MAULDIN & PETERS-KENNEDY., 2016). A transmissão do vírus ocorre através do contato de animal para animal ou fômites, e as lesões podem variar de acordo com o de desenvolvimento e do tipo de papiloma envolvido.

Figura 1. Tipos de papilomavírus (BPV) causadores da papilomatose bovina.

| Vírus | Localização e tipo do tumor |
|--------|--|
| BPV-1 | Fibropapiloma da pele, tetos, rúmen, genital e bexiga. Papiloma de bexiga e sarcoide equino |
| BPV-2 | Fibropapiloma da pele, tetos, rúmen, Papiloma do rúmen, neoplasia de bexiga, sarcoide equino |
| BPV-3 | Papiloma cutâneo |
| BPV-4 | Papiloma da cavidade oral, esôfago, rúmen. Neoplasia bexiga |
| BPV-5 | Fibropapiloma de tetos e rúmen. Papiloma de rúmen |
| BPV-6 | Papiloma de teto |
| BPV-7 | Papiloma de teto |
| BPV-8 | Papiloma e fibropapiloma cutâneos |
| BPV-9 | Papiloma de teto |
| BPV-10 | Papilomas de teto e língua |
| BPV-11 | Papiloma cutâneo |
| BPV-12 | Papiloma da língua |
| BPV-13 | Papiloma da orelha, sarcoide equino |

Adaptado de MAUDING & PETERS-KENNEDY (2016)

Segundo Gava et al (2002) bovinos que pastoreiam em áreas altamente invadidas por samambaia frequentemente são acometidos por papilomatose alimentar e por carcinomas de células escamosas no trato digestório superior. Acredita-se que esses tumores sejam induzidos pela ação dos carcinógenos da samambaia e/ou por meio da diminuição da resposta imunológica do animal frente aos vírus causadores de tumores (SOUTO et al., 2006a), sendo

que a ingestão de samambaia juntamente com os papilomavírus (BPV-1, BPV-2, e BPV-4) tem sido associada com variados tipos de tumores na bexiga e no trato digestório (MAULDIN & PETERS-KENNEDY 2016).

2.6.4 Hematúria Enzoótica Bovina

A hematúria enzoótica bovina (HEB), também conhecida por hematúria vesical bovina, cistite crônica hemorrágica, hematúria essencial e hematúria vesical crônica (FRANÇA, TOKARNIA, PEIXOTO, 2002). É uma enfermidade de evolução crônica ocorrendo quando os animais ingerem quantidades inferiores a 10g/kg de peso vivo por dia durante um ou mais anos (TOKARNIA et al., 2000).

É caracterizada pela perda de sangue na urina (hematúria), contínua ou intermitente (FALBO et al., 2005), palidez de mucosas e emagrecimento progressivo (SOUTO et al., 2006b). Outros sinais clínicos que podem ser observados em bovinos acometidos pela doença são: anemia, emagrecimento, micção frequente, debilidade, pelagem sem brilho, obstrução e infecções secundárias do trato urinário e microhematúria (FRANÇA, TOKARNIA, PEIXOTO, 2002).

É comum ocorrer intervalos sem a presença dos sinais clínicos que podem perdurar por semanas ou meses, sendo possível ocorrer uma melhora significativa de animais em fase inicial da enfermidade se forem retirados dos pastos invadidos pela planta e, receberem uma dieta equilibrada e de boa qualidade, porém, havendo nova ingestão, ocorre novamente a presença da hematúria (TOKARNIA et al., 2000). Devido à perda de sangue e, a não reposição pela medula, anemia aplástica, é comum que em vacas gestantes ocorra abortamento (CARVALHO et al., 2011).

A doença é determinada por processos neoplásicos e/ou hiperplásicos da mucosa da bexiga, que podem variar desde alguns milímetros até vários centímetros de diâmetro, porém, em alguns casos a presença de hematúria pode não estar relacionada com a presença de neoplasias e sim à presença de lesões não neoplásicas, tais como congestão e ectasia de vasos sanguíneos (TOKARNIA et al., 2012). O pH alcalino da urina dos bovinos (7,5 -8,5) predispõe a formação de neoplasias por favorecer a transformação do ptaquilosídeo em dienona (CRUZ; BRACARENCE, 2004).

Avaliações hematológicas revelam anemia progressiva, redução do hematócrito, aumento da fragilidade de eritrócitos e linfocitose (FRANÇA, TOKARNIA, PEIXOTO, 2002). Na mucosa vesical pode-se observar congestão, ectasia vascular, hemorragias multifocais ou

formação nodulares que apresentam coloração esbranquiçada, amarelada ou avermelhada e distribuição focal, ou em toda a parede da bexiga (FRANÇA, TOKARNIA, PEIXOTO, 2002; OLIVEIRA et al, 2011).

2.6.5 Intoxicação Experimental

Em 1960, Rosenberger e Heeschen demonstraram experimentalmente o envolvimento da, então, *P. aquilinum* no desenvolvimento na Hematúria enzoótica bovina, ao oferecerem a samambaia para cinco bovinos sem idade definida e sem contato prévio com a planta. Todos os animais desenvolveram HEB após 12 a 15 meses de experimento, sendo que quatro desses animais vieram a óbito por diátese hemorrágica (FRANÇA, TOKARNIA, PEIXOTO, 2002).

Em 1965, Rosenberger realizou um experimento com quatro bovinos, sendo que a ingestão da, então, *pteridium aquilinum* era reduzida ou suspensa periodicamente. Três bovinos com aproximadamente 2 anos de idade recebiam 2kg de feno de samambaia e, após 8 meses um animal apresentou microhematúria e, um tempo após os outros animais também manifestaram microhematúria e em consequência HEB, diátese e vieram a óbito (FRANÇA, TOKARNIA, PEIXOTO, 2002).

Em 2015, com o objetivo de avaliar a produção diária de leite, peso corporal e manifestações clínico patológicas, duas vacas em lactação foram submetidas ao consumo de samambaia seca em doses subtóxicas, de 2g/kg/dia por 29 dias e, 6g/kg/dia por 36 dias. Não foram verificadas alterações nos parâmetros avaliados demonstrando que o consumo da samambaia em doses subtóxicas fornecidas não foi suficiente para promover as alterações (ALVARENGA et al.,2015).

REFERÊNCIAS

- ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de la Facultad de agronomia**, Maracaibo, n.16, p. 528-541, 1999.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; AVERDÃO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. **Current medicinal chemistry**, Schipol, v. 9, n. 6, p. 675-686, 2002.
- ANJOS, B. L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28, n.10, p. 501-507, out. 2008.
- ANJOS, B. L. et al. Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, rio de janeiro, v.29, n.9, p.753-766, 2009.
- BARROS, C.S.L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no rio grande do sul. **Revista a hora veterinária**. Porto alegre, v.7, p. 333-339, 1987.
- BORZACCHIELLO G., AMBROSIO V., GALATI P., POGGIALI F., VENUTI A. & ROPERTO F. The pagetoid variant of urothelial carcinoma *in situ* of urinary bladder in a cow. **Veterinary. Pathology**. v.38, n.1, p.113-116, 2001.
- CAMPO M.S., JARRETT W.F.H., BARRON R., O'NEIL B.W. & SMITH K.T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Canc. Res.** v.52, p.6898-6904, 1992.
- CLAUS, M. P; VIVIAN, D; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, n.7, p. 314- 318, jul 2007.
- CRUZ, G. D. et al. Alterações anátomo-histopatológicas em ratos submetidos à dieta com extrato de broto de samambaia (*Pteridium aquilinum* var. *arachnoideum*) de dois municípios do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 409-411, 2005.
- CRUZ, G. D.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Toxicidade da Samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) para a saúde animal e humana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n.3, p. 249-258, 2004.

- DURÃO, C. J. F. et al. Pathological and clinical aspects of bovine enzootic hematuria. **Revista Portuguesa De Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 60, n.515, p. 132-137, 1995.
- FALBO, M. K. et al. Hematological, biochemical, urinary and histopathological changes in natural intoxication in bovine by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) (L.) kuhn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n. 4, p.547-558, 2005.
- FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P.V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.85-96, 2002.
- FURLAN, F. H. et al. intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n.4, p. 343-348, 2014.
- GAVA, A. Intoxicações por plantas de ação anti-hematopoiética e mutagênica. In:RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D.C. **Doenças de ruminantes e quinos**. Pelotas: UFEel, 1994.p 247-258.
- GAVA A., NEVES D.S., GAVA D., MOURA T.S., SCHILD A.L. & RIET-CORREA F. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in Southern Brazil. **Vet. Human Toxicol.** v.44, p.362-365, 2002.
- GIL COSTA, R. M. et al. Bracken-associate human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal Of Hazardous Materials**, Amsternam, v.1, n.12, p.203-204, 2012.
- HIRONO, I. et al. Induction of tumors in ACI Rats Given a diet containing Ptaquiloside, a Bracken Carcinogen. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.79, n.5, p. 1143-1149, 1987.
- HIRONO, I; FUSHIMI, K.; MATSUBARA, N. Carcinogenicity test of shikimic acid in rats. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.1, p. 9-10, 1977.
- HOJO-SOUZA, N. S.; CARNEIRO, C. M.; SANTOS, R. C. *Pteridium aquilinum*: o que sabemos e o que ainda falta saber. **Bioscience Jornal**, Uberlândia, v.26, n.5, p. 798-808, set/out. 2010.

- MAULDIN E.A. & PETERS-KENNEDY J. 2016. Integumentary system, p.509-736. In: MAXIE M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol. 1. 6th ed. Elsevier, St. Louis.
- MARÇAL, W. S. Samambaia em pasto é veneno. **Folha de Londrina**, Londrina, n.718, p. 13, 24 mar. 1990.
- MARÇAL, W. S. et al. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná, Brasil. **Semina**, Londrina, v.22, n.2, p. 139-144, 2001.
- MARÇAL, W. S. et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Aberdeen angus. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n. 1, p. 77-81, 2002.
- MARÇAL, W. S.. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. **Semina. Ciências Agrárias (Impresso)**, v. 24, p. 197-208, 2003.
- MARTINI-SANTOS, B. J. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação experimental por *Pteridium arachnoideum* (Dennstatiaceae) em equinos. 2010, 71f. **Dissertação (mestrado em medicina veterinária)** - instituto de veterinária, universidade federal rural do rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- MARTINI-SANTOS, B. J. et al. Surto de intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* (*Kaulf*) em bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.32, n.2, p. 92-96, abr/jun. 2010.
- MATOBA, M. et al. assay of Ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. **Mutagenesis**, Oxford, v.2, p. 419-425, 1987.
- MOREIRA, M. V. L. Frequência e Aspectos Patológicos das Doenças Oculares em Animais. **Tese de Mestrado em Ciência Animal**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.
- NIWA, H. et al. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpine glucoside from bracken. *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 24, p. 4117-4120, 1983.
- O'DRISCOLL, C.; RAMWELL, C.; HARHEN, B.; MORRISON, L.; CLAUSON-KAAS, F.; HANSEN, H. C. B.; CAMPBELL, G.; SHEAHAN, J.; MISSTEAR, B.; XIAO, L. Ptaquiloside

in irish bracken ferns and receiving waters, with implications for land managers. **Molecules**, v. 21, 2016.

PINTO, C. A. Hematúria Enzoótica Bovina: Contribuição para o seu estudo e etiopatogênico. **Tese De Doutoramento Em Ciências Veterinárias**. Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

RASMUSSEN, L. H. et al. Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent Ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. **Chemosphere**, Oxford, v.51, p 117-127, 2003.

RAVE V.G., SÁNCHEZ F.O. & LUQUE F.E. Estudio clinicopatológico de la hematuria vesical bovina. **Revta ICA**, Bogotá, 13(4):671-679. 1978.

RIBEIRO, S. C. et al. Regeneração natural em áreas desmatadas e dominadas por *Pteridium aquilinum* (L.) kuhn. na serra da mantiqueira. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 65-76, jan/ mar. 2013.

SANTOS, R.C.; BRASILEIRO FILHO, G.; SILVA, M. E. tumorigenicity of boiling water extract of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 72-76, 1992.

SHAHIN, M. et al. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated Ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. **Biochemical and Biophysical research communications**, Orlando, v.244, p.192-197, 1998.

SIPPEL, L. Bracken fern poisoning. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 121:9-13, 1952.

SMITH, B. L.; LAUREN, D. R.; PRAKASH, A. S. Bracken fern (*Pteridium*): toxicity in animal and human health. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Ed.). Bracken fern: toxicity, biology and control. **Aberystwyth: International Bracken Group**, 1999. P. 76-85.

SOUTO, M. A. M. et al. Neoplasias de bexiga associada à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria. V.36, n. 5, p. 1647-1650, 2006.

THOMSON, J. A. morphological and genomic diversity in the genus *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). **Annals of botany**, London, n.85, p.77-99, 2000.

- THOMSON, J. A. morphotype and conflicting taxonomies in *Pteridium* (Dennstaedtiaceae: Pteridophyta). **Fern Gazette**, London, v.18, p.101-109, 2008.
- THOMSON, J. A. Taxonomic status of diploid southern hemisphere bracken (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae). *Telopea*. **Journal Of Plant Systematics**, Sidney, v.14, p43-48, 2012.
- THOMSON, J. A. Toward a taxonomic revision of *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). *Telopea*. **Journal Of Plant Systematics**, Sidney, v.10, p.793-803, 2004.
- TOKARIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil**. 2 ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 586 p.
- TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Editora. Helianthus, Rio de Janeiro, p. 320, 2000.
- VILLALOBOS-SALAZAR, J. et al. Factors which may affect Ptaquiloside levels in milk; effects of altitude, bracken fern growth stage, and milk precessing. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Ed.). *Bracken fern: toxicity, biology and control*. Aberystwyth: **International Bracken Group**, 1999. P.68-73.
- YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product Reports**, London, v. 24, p. 798-813, 2007.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Verificar o efeito da ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum* nas manifestações clínicas, e laboratoriais de novilhas Nelores suplementadas a pasto.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos da ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum* nos parâmetros hematológicos, presença de microhematúria de novilhas gestantes ou não gestantes;
- Avaliar a presença de papilomavírus bovino em amostras de sangue das novilhas gestantes ou não, submetidas à ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum*.

CAPÍTULO II

Avaliação clínica e laboratorial de novilhas nelores à intoxicação por *Pteridium arachnoideum* após ingestão de doses subtóxicas

RESUMO

Pteridium arachnoideum, popularmente nominada de samambaia, é conhecida também como pluma e samambaia do campo e está disseminada na maioria das propriedades rurais, é considerada uma planta tóxica muito importante. As doenças relatadas em rebanhos de bovinos em áreas com a presença da samambaia incluem a intoxicação aguda (diátese hemorrágica) e crônica (carcinomas das vias digestórias superiores e hematúria enzoótica bovina – HEB). Dentre as três formas clínicas acima descritas, a HEB é a de maior incidência. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum* nas manifestações clínicas, e laboratoriais de novilhas nelores suplementadas a pasto. Vinte e duas fêmeas foram selecionadas e separadas em três grupos: 10 gestantes, 10 não gestantes, e 2 não gestantes em lactação. Os animais foram confinados em um piquete de 0,5 hectares com grama estrela (*Cinodon dactylon*) contendo cochos coletivos em uma propriedade localizada na cidade de Regente Feijó- SP. Dieta: água *ad libitum*; suplemento concentrado (0,3%/PV/cab/dia) comercial e sal mineralizado com 40g de fósforo. Ofertada uma vez ao dia, durante os 120 dias de tratamento, adicionada de *P. arachnoideum* na dose de 4 g/kg PV. Os três grupos foram monitorados por meio de hemograma e urinálise a cada 15 dias, durante 120 dias. A partir dos 60 dias de experimento foi possível observar presença de microhematúria nos exames urinários.

Palavras chave: Samambaia, planta tóxica, hematúria enzoótica bovina.

ABSTRACT

Pteridium arachnoideum, popularly known as fern, is also known as feather and fern of the field and is widespread in most rural properties, is considered a very important toxic plant. Diseases reported in cattle herds in areas with fern include acute intoxication (haemorrhagic diathesis) and chronic intoxication (upper digestive tract carcinomas and enzootic bovine hematuria - HEB). Among the three clinical forms described above, HEB is the one with the highest incidence. The objective of this work was to verify the effect of the ingestion of subtoxic doses of *Pteridium arachnoideum* in the clinical manifestations, and laboratory of nellor heifers supplemented to pasture. Twenty-two females were selected and separated into three groups: 10 pregnant women, 10 non-pregnant women, and 2 non-pregnant women. The animals were confined in a 0.5-hectare picket with star grass (*Cinodon dactylon*) containing collective cocks in a property located in the city of Regente Feijó- SP. Diet: water ad libitum; concentrate supplement (0.3% / PV / hr / day) and mineralized salt with 40g of phosphorus. Offered once daily during the 120 days of treatment, added *P. arachnoideum* at the dose of 4 g / kg PV. The three groups were monitored by means of hemogram and urinalysis every 15 days for 120 days. From the 60 days of the experiment it was possible to observe the presence of microhematuria in the urinary exams.

Key words: Fern, toxic plant, bovine enzootic hematuria.

INTRODUÇÃO

Pteridium arachnoideum, mais conhecida como samambaia é uma planta perene, rizomatosa, herbácea, ereta e ramificada, podendo medir entre 50 a 180 centímetros de altura (TOKARNIA et al., 2000). É comum se desenvolver em solos pobres, ácidos (HOPKINS, 1990), arenosos e de baixa fertilidade. Infesta campos, matas ciliares, capoeiras, beiras de matos e de estradas. O princípio tóxico está presente em todas as partes da planta, porém o broto é a porção mais tóxica de suas partes aéreas (HIRONO et al., 1973) e, mesmo quando dessecada ainda pode conservar a sua toxicidade (TOKARNIA; DOBEREINER; SILVA, 1979).

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma enfermidade de evolução crônica que pode ser observada em bovinos que ingeriram a samambaia em quantidades inferiores a 10g/kg durante um ou mais anos (MAXIE., 1993; TOKARNIA et al., 2000). É caracterizada pelo desenvolvimento de lesões hemangiomas na parede da bexiga urinária e clinicamente por hematúria intermitente e emaciação, ocorrendo perda de sangue sem reposição pela medula (anemia aplástica), podendo acometer vacas prenhes e causar abortamento (MARÇAL et al., 2001).

A macro e microhematúria são encontradas nos animais acometidos pela HEB com a duração variando de um animal para outro, podendo ser de um dia a várias semanas com períodos de remissão com duração de semanas a anos (DURÃO; FERREIRA; CABRAL, 1995). Hopkins (1987) comparou animais com e sem hematúria verificou que 8% dos animais que aparentemente se mostravam sadios apresentavam hemácias no sedimento urinário, sugerindo que este fato representaria um estágio pré-clínico da hematúria enzoótica.

Tendo em vista que essa enfermidade ainda é vista como um problema econômico em diversos estados brasileiros, esse trabalho teve como objetivo identificar a fase subclínica da doença através de análises hematológicas e bioquímicas na urina.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética para o uso de animais (CEUA), sob o protocolo número 005/17.

Foram selecionadas vinte e duas novilhas da raça Nelore com 24 a 36 meses de idade e escore corporal 2 a 3 com média de peso de 315kg de peso vivo. Das 22 fêmeas selecionadas, 10 estavam gestantes, 12 não estavam gestantes, sendo duas em lactação. Os animais foram confinados em um piquete de 0,5 hectares com grama estrela (*Cinodon dactylon*) contendo cochos coletivos em um sítio localizado na cidade de Regente Feijó- SP.

Folhas de *P. arachnoideum* foram colhidas a cada 15 dias no município de Arapongas, estado do Paraná (23°22'21.4" S e 51°26'35.6" W) foram dessecadas à sombra e ensiladas com intuito de diminuir o tamanho da partícula e posteriormente foram acondicionadas em sacos de algodão. Os animais foram separados em três grupos. O grupo 1, compreende 10 fêmeas gestantes em terço inicial que ingeriram samambaia; grupo 2, compreende 10 fêmeas não gestantes que ingeriram samambaia e o grupo 3, duas fêmeas em lactação não gestantes que ingeriram samambaia.

Os três grupos de animais foram monitorados por meio de avaliação clínica, laboratorial (hemograma e urinálise) nos dias (D0)0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 do experimento / início da ingestão de samambaia. As amostras de sangue foram colhidas da veia coccígea média e as amostras de urina foram colhidas durante a micção espontânea. A urinálise foi realizada por meio de tiras reagentes comerciais (Urigold[®]), analisando-se o conteúdo de proteína, urobilinogênio e hemoglobina. A análise do sedimento urinário foi realizada para pesquisa de microhematúria, detectada pela presença de eritrócitos na urina (MARÇAL et al., 2002) utilizando como parâmetro 5000 hemácias/ml (FALBO et al., 2005). As amostras foram centrifugadas a 1800 rpm durante cinco min e após a centrifugação o sobrenadante (9 mL) foi desprezado. Em seguida, foi realizada a leitura em câmara de *Neubauer* utilizando microscópio óptico na objetiva de 40x e a contagem das células presentes no quadrante central da câmara (MARÇAL et al., 2001).

Dieta: água *ad libitum*; suplemento concentrado (0,3%/PV/cab/dia) comercial e sal mineralizado 40g de fósforo. Ofertada uma vez ao dia, durante os 120 dias de tratamento, adicionada de *P. arachnoideum* na dose de 4 g/kg PV. Para o grupo das vacas tratadas o arraçoamento foi fornecido em cochos coletivos para possível avaliação de consumo.

Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para as variáveis ganho de peso e microhematúria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dias D0, D15, D30 e D45 do experimento não foram detectadas alterações na urina, tanto na fita reagente, quanto na microscopia, provavelmente devido ao efeito acumulativo do princípio tóxico no organismo e ao fato da dose administrada ser subtóxica (4g/kg/PV) não havendo tempo suficiente para que as manifestações clínicas ocorrem.

Os resultados da urinálise dos animais avaliados nos dias D60, D75, D90, D105 e D120 estão demonstrados na Tabela 1. Na tabela 2 são apresentados os valores médios dos eritrograma e na tabela 3 os resultados da análise estatística comparando o ganho de peso com a presença da microhematúria.

Em relação a urinálise, o método de tiras reagentes é de alta sensibilidade e especificidade (SANCHEZ VILLALOBOS et al., 2006) e o exame microscópico do sedimento urinário revela alta capacidade de detectar um bovino com HEB. Na tabela 1 à microscopia pode-se observar que, algumas novilhas que começaram a liberar as hemácias na urina de forma contínua, porém outros animais tinham a liberação em um dia e em outros não, coincidindo com Falbo et al (2005) que afirma que a hematúria ocorre de forma intermitente.

O resultado médio normal do eritrograma encontrado no presente trabalho após 120 do experimento pode ser explicado pelo fato de que a maioria dos animais estudados se encontravam na fase de microhematúria (dezenove animais), sendo o esperado que ocorresse uma redução no volume globular, hemoglobina e no número de hemácias, desenvolvendo uma anemia nos casos em que se ocorra uma perda contínua significativa das hemácias (VILLALOBOS et al.,2004).

Tabela 1 Resultados das contagens de hemácias na urina, pela câmara de Neubauer. Evidenciando microhematúria dos 60 aos 120 dias de experimento.

| | Nº ANIMAL | DIAS DE EXPERIMENTO | | | | |
|-----------------|-----------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | D60 | D75 | D90 | D105 | D120 |
| GESTANTE | V1 | --- | --- | --- | --- | 5X10 ³ |
| | V8 | --- | --- | --- | --- | 2X10 ³ |
| | V14 | --- | --- | 6X10 ³ | --- | 4X10 ³ |
| | V17 | --- | --- | --- | 2X10 ³ | 3X10 ³ |
| | V21 | 3X10 ³ | --- | --- | --- | --- |
| | V26 | --- | --- | --- | --- | 2X10 ³ |
| | V28 | --- | --- | 2X10 ³ | --- | --- |
| | V29 | --- | --- | --- | 2X10 ³ | 6X10 ³ |
| NÃO GESTANTE | V9 | 4X10 ³ | --- | 5X10 ³ | 5X10 ³ | --- |
| | V10 | --- | 4X10 ³ | 3X10 ³ | 3X10 ³ | 4X10 ³ |
| | V13 | --- | 6X10 ³ | --- | --- | --- |
| | V15 | --- | --- | --- | --- | 9X10 ³ |
| | V16 | --- | 2X10 ³ | 2X10 ³ | 4X10 ³ | --- |
| | V18 | --- | --- | --- | 6X10 ³ | --- |
| | V19 | 1X10 ³ | --- | --- | --- | 5X10 ³ |
| | V20 | --- | 5X10 ³ | --- | 8X10 ³ | 3X10 ³ |
| | V24 | --- | 3X10 ³ | --- | --- | 5X10 ³ |
| | V25 | --- | --- | 6X10 ³ | --- | 2X10 ³ |
| V27 | --- | 3X10 ³ | --- | --- | --- | |

Alguns estudos relataram que as mudanças hematológicas foram evidentes com o início da macrohematúria (RAJENDRAN et al.,1983), porém Ghergariu, Bale e Oros (1990) observaram anemia tanto em animais com micro como em animais com macrohematúria, sendo de forma progressiva à medida que se aumenta a perda de hemácias para a urina e regrida conforme a hematúria cesse. Fato que não pode ser observado no presente estudo, visto que, foi realizado com fêmeas que não tiveram acesso a samambaia anteriormente e o tempo de exposição à planta foi relativamente curto e a dose de 4 gramas ser considerada subtóxica, não havendo tempo hábil para o desenvolvimento de lesões mais consistentes.

Os leucócitos das novilhas estavam dentro da normalidade, coincidindo com o Smith et al. (2000) e Sanchez Villalobos et al. (2004), exceto em alguns animais que apresentaram leucocitose transitória que ora, coincidem com a detecção de hemácias na urina, ora não. Isto ocorreu em vacas dos três grupos, que pode ser explicado pelo fato da manifestação clínica da intoxicação por *Pteridium arachnoideum* ser dependente da quantidade ingerida e do tempo de ingestão da planta; assim, doses baixas promovem quadros clínicos de intoxicação após meses ou anos de consumo, induzindo a forma crônica e doses maiores ingeridas por dias ou semanas resultam na manifestação aguda da doença.

As 19 amostras de sangue total submetidas a PCR com intuito de detectar um fragmento parcial do gene L1 de BPV foram negativas, mostrando que não houve interação do BPV com a presença da microhematúria, sendo então a liberação das hemácias na urina por efeito apenas da samambaia.

Tabela 2. Valores hematológicos (média) de novilhas submetidas ao tratamento com doses subtóxicas de *P. arachnoideum*.

| | Ht(%) | | | Hb(g/dl) | | | He ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | | | VCM | | | CHCM | | | Leucócitos totais | | |
|------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|----------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|--------|--------|
| | G1 | G2 | G3 | G1 | G2 | G3 | G1 | G2 | G3 | G1 | G2 | G3 | G1 | G2 | G3 | G1 | G2 | G3 |
| D0 | 35,25 | 33,44 | 23,5 | 12 | 10,92 | 8,2 | 8,52 | 8,1 | 5,62 | 40,9 | 41,4 | 40,7 | 34 | 32,65 | 36,05 | 12.570 | 14.320 | 9.600 |
| D60 | 39,3 | 37,68 | 34,65 | 13,45 | 12,52 | 11,85 | 9,36 | 8,97 | 7,45 | 42,05 | 45,35 | 48,05 | 34,25 | 33,26 | 34,25 | 11.810 | 11.590 | 12.050 |
| D120 | 43 | 37,76 | 30,45 | 14,4 | 12,94 | 10,55 | 9,46 | 8,73 | 6,74 | 45,5 | 46,63 | 46,9 | 33,5 | 34,3 | 36,95 | 10.800 | 10.250 | 8.500 |

G1: novilhas gestantes; G2: novilhas não gestantes; G3: vacas não gestantes em lactação

Na tabela 3, pode-se observar que não houve diferença de ganho de peso para os animais que tiveram ou não a microhematúria, mostrando que o consumo da samambaia na dose de 4g/kg/PV foi de forma linear, comprovando que não foi um maior consumo de samambaia que colaborou para o aparecimento da microhematúria.

Tabela 3: Relação de ganho de peso e presença de microhematúria em novilhas submetidas a dieta contendo doses subtóxicas de *Pteridium arachnoideum* em um período de 120 dias.

| Variáveis | Número de animais | Média | Mínimo | Máximo |
|----------------------|-------------------|-------|--------|--------|
| GMD (animais sem MH) | 6 | 0,254 | -0,067 | 0,558 |
| GMD (animais com MH) | 14 | 0,262 | -0,033 | 0,633 |

P-valor (teste de Mann-Whitney): 0,8688; Coeficiente de correlação de Pearson: 0,02.

CONCLUSÃO

A ausência de manifestações clínicas e alterações hematológicas significativas evidenciaram que o consumo de samambaia na dose fornecida (4 gr/kg/PV/dia) durante 120 dias não foi suficiente para promover tais alterações, porém, a presença de alterações urinárias, como a microhematúria, mostrou que a detecção da mesma se torna eficaz para a identificação da fase subclínica da HEB, e também o caráter acumulativo da toxicidade.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio na pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O. M. **Veterinary Medicine**. 7ed. Philadelphia: Baillière Tindas, 1989.
- DURÃO, J. F. C.; FERREIRA, M. L.; CABRAL, A. Aspectos anatomopatológico e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.90, n.515, p.132-137, 1995.
- FALBO, M. K; REIS, A. C. F.; BALARIN, M. R. S. BRACARENSE, A. P.F.R. L. ARAUJO JR, J. P.; OKANO, W.; SANDINI, I. E. Hematological, biochemical, urinary and histopathological changes in natural intoxication in bovine by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) (L.) Kuhn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n. 4, p.547-558, 2005.
- GHERGARIU, S.; BALE, G.; OROS, N. A. Unele modificari hematologice, biochimice sanguine si urinare la taurine intr-o-zona de hetaturie enzoótica. **Revista de zootehnie Si medicina veterinara**, Bucuresti, n.5-6, p.15-23, 1990
- HIRONO, I.; FUSHIMI, K.; MORI, H. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v.50, n.5, p.1367-1371, 1973.
- HOPKINS, N. C. G. Enzootic Haematuria en Nepal. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.19, p. 156-164, 1987
- HOPKINS, N. C. G. Bracken (*Pteridium aquilinum*): its distribution and animal health implications. **British Veterinary Journal**, London, .146, n.4, p. 316-326, 1990
- MARÇAL, W. S. GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; GARGANTINI, M.; FERNANDES, R. P.; MONTEIRO, A.A. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná – Brasil. **Semina**, Londrina, v.22, n.2, p.139-144, jul./dez 2001.

MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; MONTEIRO, F. A. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Abceerden angus. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.7, n.1, p.77-81, 2002.

MAXIE, M. G. The urinary system. Enzootic hematuria. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Eds). *Pathology of domestic animals*. 4th ed. San Diego: Academic Press. San Diego, p.534-536 1993

MUELER, S. B.; MADUREIRA, F. R.; ALENCAR FILHO, R. A.; RIBEIRO, L. O. C.; SOUZA, J. A. Tentativa de reprodução experimental da hematúria enzoótica em bovinos pela administração de samambaia. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.42, p.203-212, 1975.

PAMUKCU, A. M.; GOKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary bladder neoplasms induced by feed bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Research*, Philadelphia, v.27, n.1, p.917-924, 1967.

RAJENDRAN, M. P; CHENNAKESAVALU, M.; NARAYANA RAO, C. V.; VIRAGHAVAN, K.; DAMODARAM, S. Experimental production of enzootic bovine haematuria with bracken fern. **Indian Journal of veterinary Sciencel**, New Delhi, v.60, n.3, p. 173-178, 1983

SANCHEZ VILLALOBOS, A.; ARRAGA DE ALVARADO, C. M.; VILLARROEL NERI, R.; PINO RAMIREZ, D.; GARCIA BRACHO, D.; SANCHEZ COMBITA, G. Validity, accuracy and coefficient of probability of the test urine reactive strips and microscopic examination of the urinary sediment in the diagnosis of bovine enzootic hematuria. **Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinárias**, Maracaibo, v.16, n.6, p.604-612, 2006.

SMITH, B.L.; LAUREN, D.; SEAWRIGHT, A.; SHAHIN, M.; PRAKASH, A.S. Helechos: la toxicidad animal y la salud humana. La Habana: Memorial, 2000. p. 2-11. (Curso Internacional de Toxicosis por Plantas).

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SILVA, M. F. Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus: INPA, 1979.

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

ANEXOS

Anexo A. Comitê de ética para o uso de animais – CEUA



COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta “*Avaliação clínica e da pré-disposição de vacas gestantes à intoxicação por Pteridium arachnoideum após a ingestão de doses subletais e resíduos no leite*”, registrada no Comitê de ética para o uso de animais, com o nº 005/17, sob a responsabilidade de Luiz Fernando Coelho Cunha Filho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de ensino ou desenvolvimento de recursos didáticos – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) em reunião de 21/03/2017.

| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
|-------------------------|--|
| Vigência da autorização | 30/03/2017 a 27/02/2019 |
| Espécie/Linhagem/Raça | <i>Bos taurus taurus</i> – Bovinos; <i>Rattus rattus</i> - Ratos |
| Nº de animais | 18 bovinos e 32 ratos |
| Peso/idade | Bovinos 400 kg |
| Sexo | Bovinos fêmeas / Ratos (machos e fêmeas) |
| Origem | Regente Feijó, SP |

Arapongas, 21 de março de 2017.



Profª Drª Fabiola Cristine de Almeida do Rego Grecco
Coordenadora do CEUA



Profº Drº Flavio Guiselli Lopes
Vice coordenador do CEUA

Fabiola Cristine de A. R. Grecco
Coordenadora
Comissão de Ética no uso de Animais - UNOPAR