

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

TROPONINA C NA DETECÇÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DE ALTERAÇÕES REGRESSIVAS
PRECOCES NO MIOCÁRDIO DE BOVINOS E
OVINOS INTOXICADOS POR
MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO

André Marandola dos Santos

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA / CIÊNCIAS CLÍNICAS

TROPONINA C NA DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE
ALTERAÇÕES REGRESSIVAS PRECOSES NO MIOCÁRDIO DE
BOVINOS E OVINOS INTOXICADOS POR MONOFLUOROACETATO
DE SÓDIO

André Marandola dos Santos

Sob a orientação da professora
Vivian de Assunção Nogueira

e co-orientação do professor
Paulo Vargas Peixoto

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro 2015

636.1089

S237t

T

Santos, André Marandola dos, 1989-
Troponina C na detecção imuno-
histoquímica de alterações
regressivas precoces no miocárdio
de bovinos e ovinos intoxicados por
monofluoroacetato de sódio / André
Marandola dos Santos - 2015.

59 f.: il.

Orientador: Vivian de Assunção
Nogueira.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária -
Patologia/Ciências Clínicas.

Bibliografia: f. 46-57.

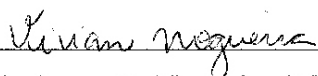
1. Bovino - Doenças - Teses. 2.
Ovino - Doenças - Teses. 3. Plantas
venenosas - Teses. 4. Miocárdio -
Teses. 5. Imunohistoquímica -
Teses. 6. Toxicologia veterinária -
Teses. I. Nogueira, Vivian de
Assunção, 1980-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária - Patologia/Ciências
Clínicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

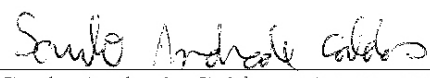
ANDRÉ MARANDOLA DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

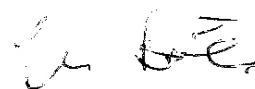
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2015



Vivian de Assunção Nogueira, MV, Dra. UFRRJ
Orientadora



Saulo Andrade Caldas, MV, Dr. UFRRJ



Jürgen Döbereiner, MV, Dr. EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Armando Almeida dos Santos e Maria Iolanda Marandola dos Santos, que foram fontes de amor incondicional, ensinamentos morais e me apoiaram durante minha trajetória sem vacilar por qualquer momento.

Ao meu irmão, Luciano Marandola dos Santos que me serviu de exemplo de dedicação e sabedoria, mostrou que o reconhecimento é fruto de anos de trabalho duro e me apoiou para minha formação.

À minha orientadora, Vivian de Assunção Nogueira, que me permitiu ingressar no setor, acreditou no meu trabalho e me deu a primeira oportunidade na área de Patologia Animal. Agradeço pela confiança depositada em mim e a orientação para desenvolvimento do projeto e de minha vida acadêmica

Ao professor Paulo Vargas Peixoto, que foi fonte inesgotável de conhecimento durante todo o mestrado, fornecendo o que fosse necessário para sucesso acadêmico de todo o grupo de pesquisa.

Aos professores Carlos Hubinger Tokarnia, Ticiano do Nascimento França e Marilene Farias de Brito pelos ensinamentos passados tanto na graduação, como no mestrado de forma generosa e dedicada.

Aos amigos de laboratório, Mariana d'Ávila, Samay Zillmann, Ana Paula Pires, Gabriela Cid, Ileana Miranda, Daniel Ubiali, Rhudson Vilarinho, Letícia Pinto e Mariana Oliveira, que contribuíram para o crescimento do grupo de pesquisa e trouxeram a alegria de sempre trabalharmos com pessoas queridas.

À minha avó, Piedade Almeida dos Santos (*in memoriam*), por me acolher, incentivar e se orgulhar, por menor que fosse minha vitória.

RESUMO

SANTOS, André Marandola. **Troponina C na detecção imuno-histoquímica de alterações regressivas precoces no miocárdio de bovinos e ovinos intoxicados por monofluoroacetato de sódio**. 2015. 59p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Ao que tudo indica, o monofluoroacetato de sódio (MF) é o princípio tóxico das numerosas plantas que causam “morte súbita” no Brasil. Eventualmente, observam-se, nos animais intoxicados por MF, grupos de cardiomiócitos com aumento da eosinofilia citoplasmática. Essas alterações cardíacas, no entanto, na maioria dos casos, ainda incipientes, de difícil interpretação e sem reação inflamatória, devem ser diferenciadas de artefato. O presente trabalho teve como objetivo detectar a presença de alterações regressivas precoces no miocárdio de bovinos e ovinos intoxicados experimentalmente por MF, através da imuno-histoquímica com troponina C (cTnC). Fragmentos de coração de seis bovinos (três que receberam, por via oral, doses únicas de 0,5 mg/kg e, os demais, 1,0 mg/kg de MF) e cinco ovinos (um recebeu, por via oral, dose única de 0,5 mg/kg, outros dois receberam doses de 1,0 mg/kg; um ovino recebeu, por via oral, doses subletais repetidas diariamente de 0,1 mg/kg/dia, por quatro dias, e outro, 0,2 mg/kg/dia por seis dias) foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica com anticorpo anti-cTnC. Nos miocárdios de bovinos e ovinos verificou-se redução dos níveis de expressão da cTnC no citoplasma de grupos de fibras musculares. Diminuição significativa na imunorreatividade ocorreu, sobretudo, em cardiomiócitos que apresentavam, no exame histopatológico, aumento da eosinofilia citoplasmática. A diminuição ou ausência da expressão da cTnC nos animais intoxicados por MF permitiu estabelecer a diferença entre necrose coagulativa de cardiomiócitos e artefato ocasionado pelo fixador. Isso indica que este método pode ser utilizado com segurança para identificação de quaisquer lesões regressivas precoces, ou não, no miocárdio, independentemente da causa. Adicionalmente, é possível afirmar que, dependendo do tempo de evolução, a toxicose por MF, bem como por plantas causadoras de morte súbita em bovinos e ovinos, podem cursar com lesões regressivas no miocárdio.

Palavras-chave: Plantas tóxicas, monofluoroacetato, miocárdio, imuno-histoquímica, troponina C, intoxicação por plantas, bovinos, ovinos.

ABSTRACT

SANTOS, André Marandola. **Troponin C in immunohistochemical detection of early regressive myocardial lesions in cattle and sheep poisoned with sodium monofluoroacetate.** 2015. 59p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Sodium monofluoroacetate (MF) is the toxic principle of several plants that cause “sudden death” of cattle in Brazil. Groups of cardiomyocytes with high cytoplasmic eosinophilia are sometimes observed in animals poisoned by MF. However, this cardiac alteration is difficult to interpret and as there is no inflammatory reaction, it must be differentiated from artifacts. The present study had the objective to detect the presence of early regressive lesions in the myocardium of sheep and cattle experimentally poisoned by MF through immunohistochemistry with troponin C (cTnC). Fragments of the heart muscle from six cattle (three received, orally, single doses of 0.5 mg/kg and the others, single doses of 1.0 mg/kg) and five sheep (one received, orally, single dose of 0.5 mg/kg, the other two received single doses of 1.0 mg/kg, one received sublethal daily doses of 0.1 mg/kg for four days, and another received daily sublethal doses of 0.2 mg/kg for six days) were submitted to immunohistochemistry with antibody anti-cTnC. In the cardiomyocytes of cattle and sheep, it was possible to observe reduction of the expression levels for cTnC in the cytoplasm of groups of cardiac muscle fibers. Significant reduction of immunoreactivity occurred overall in cardiomyocytes that presented high cytoplasmic eosinophilia. The decrease or absence of expression. for cTnC in animals poisoned by MF allowed to establish the difference between coagulative necrosis of cardiomyocytes and artifacts caused by fixation. This indicates that this method can be used safely to identify any lesions, early regressive or not, in the myocardium independently of the cause. It is also possible to affirm that poisoning by MF as well as the one caused by “sudden death” causing plants can progress with regressive myocardial lesions.

Key words: Poisonous plants, monofluoroacetate, myocardial lesions, immunohistochemistry, troponin C, plant poisoning, cattle, sheep.

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Ação do monofluoroacetato de sódio no ciclo de Krebs (PEIXOTO, 2010)	4
Figura 2	DHV das células epiteliais dos túbulos uriníferos contorcidos distais associada à cariopinicose. Bovino intoxicado por MF (1,0 mg/kg) (NOGUEIRA, 2009)	15
Figura 3	Degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear (seta). Ovino intoxicado por MF (0,2 mg/kg/dia por 6 dias) (PEIXOTO, 2010)	16
Figura 4	Arranjos em filamentos finos e grossos em músculo psoas de coelho. 150.000x (HUXLEY, 1961)	21
Figura 5	Estrutura das troponinas (PARMACEK; SOLARO, 2004)	22
Figura 6	Monofluoroacetato de sódio utilizado nos experimentos (PEIXOTO et al., 2010)	27
Figura 7	Áreas de hipereosinofilia de cardiomiócitos (detalhe). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 4x)	31
Figura 8	Diminuição da expressão para o anticorpo cTnC (detalhe). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 4x)	31
Figura 9	Focos cardiomiócitos hipereosinofílicos (seta). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 10x)	32
Figura 10	Diminuição da expressão para o anticorpo anti- cTnC (seta). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 10x)	32
Figura 11	Áreas de hipereosinofilia. Ovino 31263 (0,1 mg/kg/dia por 4 dias) (Objetiva 10x)	33
Figura 12	Diminuída expressão para o anticorpo anti- cTnC. Ovino 31263 (0,1 mg/kg/dia por 4 dias) (Objetiva 10x)	33
Figura 13	Áreas de hipereosinofilia com necrose e floculação de fibras musculares (seta). Ovino 31266 (0,2 mg/kg/dia por 6 dias) (Objetiva 20x)	34
Figura 14	Acentuada perda de expressão para anticorpo anti-troponina C (seta). Ovino 31266 (0,2 mg/kg/dia por 6 dias) (Objetiva 20x)	34

ÍNDICE DE QUADROS

PÁGINA

Quadro 1	Relação entre o quadro clínico-patológico preponderante e as espécies de animais intoxicados por MF	7
Quadro 2	Antígenos utilizados na detecção de lesões cardíacas, sua origem e o tipo de marcação celular	17
Quadro 3	Resultados comparativos entre tempo de administração, evolução e achados histopatológicos na coloração de HE e IHQ em bovinos.	35
Quadro 4	Resultados comparativos entre tempo de administração, evolução e achados histopatológicos na coloração de HE e IHQ em ovinos.	36

LISTA DE ABREVIACOES

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CoA	Coenzima A
CK	Creatinocinase
cTnC	Troponina cardíaca C
cTnI	Troponina cardíaca I
cTnT	Troponina cardíaca T
DHV	Degeneração hidrópico vacuolar associada  cariopcnose
H-FABP	Proteína ligadora de ácido graxo cardíaca
IAM	Infarto agudo do miocárdio
MB	Mioglobina
MF	Monofluoroacetato de sódio
PBS	Tampão fosfato
SAP	Setor de Anatomia Patológica
SNC	Sistema nervoso central
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	PÁGINA
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Monofluoroacetato de sódio	3
2.1.1 Propriedades físico-químicas	3
2.1.2 Modo de ação e toxicidade de monofluoroacetato de sódio	4
2.1.3 Quadro clínico-patológico	6
2.1.4 Plantas tóxicas que contêm monofluoroacetato	11
2.1.5 Terapêutica da intoxicação por monofluoroacetato de sódio	12
2.1.6 Diagnóstico, prognóstico e diagnóstico diferencial	13
2.2 Principais marcadores imuno-histoquímicos de lesão cardíaca	17
2.3 Troponina	21
2.3.1. Estrutura e função	21
2.3.2. Comportamento na lesão celular	23
2.3.3. Troponina em animais	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Local	26
3.2. Amostras de tecidos	26
3.3. Confeção das lâminas	27
3.4. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-cTnC	27
3.5. Avaliação das lâminas	28
4 RESULTADOS	29
4.1. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos	29
4.2. Protocolos experimentais	33
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8 ANEXOS	58
8.1 Animais utilizados	58

1. INTRODUÇÃO

O monofluoroacetato de sódio (MF), conhecido também como ácido monofluoroacético e composto 1080, é uma das substâncias mais tóxicas já descobertas (ZURITA et al., 2007). Em bovinos (SCHNAUTZ, 1949; ROBISON, 1970; NOGUEIRA et al., 2010) e ovinos (JENSEN et al., 1948; ANNISON et al., 1960; SCHULTZ et al., 1982; PEIXOTO et al., 2010), o principal efeito do MF se faz sobre o coração.

Ao que tudo indica, o MF é o princípio tóxico das numerosas plantas que causam “morte súbita” no Brasil e são responsáveis por, pelo menos, 600.000 mortes de bovinos por ano. De fato, o quadro clínico-patológico verificado em ruminantes que ingerem essas plantas corresponde, em grande parte, ao observado nas intoxicações experimentais em bovinos e ovinos por MF (TOKARNIA; DÖBEREIENER, 1959; NOGUEIRA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2010; PEIXOTO et al., 2011a). Em ambos os casos, a associação entre o quadro característico de morte súbita, ausência de achados de necropsia significativos e a típica degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos uriníferos contornados distais associada à cariopnicose (DHV), presente na maioria dos casos, tem grande valor diagnóstico (NOGUEIRA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2010; PEIXOTO et al., 2011a; TOKARNIA et al., 2012). Ocorre que, quanto maior a dose ingerida de MF (contido ou não em plantas), mais curto é o período para aparecimento dos sinais clínicos, isto é, animais que ingerem maiores quantidades do composto, morrem por parada cardíaca provavelmente antes que a eliminação da substância tenha causado a lesão renal significativa ou detectável ao exame histológico. Eventualmente, porém, observam-se, nos animais intoxicados por MF, grupos de cardiomiócitos com aumento da eosinofilia citoplasmática. Essas alterações cardíacas, no entanto, na maioria dos casos, ainda são incipientes, de difícil interpretação, sem reação inflamatória e, por isso, devem ser diferenciadas de artefato resultante da hipercontração de miofibras ocasionada pelo fixador (STIGGER et al., 2001) ou, ainda, lesões não diretamente relacionadas a danos miocárdicos, embora os autores não especifiquem a patogênese dessas lesões (CARMO et al., 2011).

Diversas técnicas imuno-histoquímicas com alta especificidade e sensibilidade têm sido empregadas no intuito de se detectar lesões incipientes no miocárdio. Dentre estas, destaca-se a utilização da troponina, um componente

estrutural da célula muscular que é liberado na circulação cerca de 3 a 4 horas após a lesão celular (AIRES et al., 1999; JENKINS et al., 2010); os miócitos afetados apresentam uma marcação negativa, enquanto os miócitos não-necróticos são positivos para a troponina (JENKINS et al., 2010). Um estudo recente demonstrou que, em bovinos intoxicados de forma natural por *Amorimia exotropa*, planta tóxica cujo princípio tóxico é, provavelmente, o MF, há diminuição significativa na imunorreatividade anti-troponina cardíaca C (cTnC) em cardiomiócitos degenerados ou necróticos (PAVARINI et al., 2012).

Dessa forma, esse estudo tem como intuito detectar a presença de alterações regressivas precoces no miocárdio de bovinos e ovinos intoxicados experimentalmente por MF, através da utilização imuno-histoquímica da cTnC, com o objetivo de auxiliar no diagnóstico histopatológico e, por analogia, associar a ocorrência das lesões à ingestão de MF contido nas plantas que causam morte súbita, ou seja, é uma forma indireta de demonstrar que o MF é o princípio tóxico responsável pela parada cardíaca de animais que ingerem as plantas desse grupo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Monofluoroacetato de sódio

O monofluoroacetato (MF) é um composto de alta toxicidade que foi utilizado durante muito tempo para controle de pragas em diversos países, dentre eles Brasil e EUA. Seu uso era comum como rodenticida e no controle de coiotes predadores de ovelhas através do uso de coleiras de proteção (HORNSHAW; RINGER; AULERICH, 1986; AULERICH; RINGER; SAFRONOFF, 1987; ZURITA et al., 2007). É também conhecido pelo nome de composto 1080, que foi conferido pelo Centro de Pesquisa de Animais Selvagens nos EUA após testes para controle populacional de roedores. Sua utilização no Brasil foi suspensa de acordo com a Portaria no. 321, de 28 de Julho de 1997 (BRASIL, 1997) e seu uso é restrito na Austrália (APVMA, 2008) e Nova Zelândia (EASON et al., 2011) que ainda o utilizam, com restrições e normas técnicas.

2.1.1. Propriedades físico-químicas

Monofluoroacetato é um derivado do ácido monofluoroacético e, quando encontrado sob a forma de sal de sódio, é cristalino (McGIRR; PAPWORTH, 1955), branco, inodoro, insípido (OLIVEIRA, 1955; EGEKEZE; OEHME, 1979), higroscópico quando exposto ao ar, solúvel em água, relativamente insolúvel em solventes orgânicos, tais como querosene, álcool, acetona ou óleos vegetais e animais (EGEKEZE; OEHME, 1979). É uma substância não-volátil (OLIVEIRA, 1955), quimicamente estável (GRIBBLE, 1973) à luz solar e à temperatura de 54°C (EPA, 1995), devido à forte ligação entre os átomos de carbono e flúor, resiste a temperaturas de até 110°C (BARTLETT; BARRON, 1947; EISLER, 1995) e só se decompõe a partir de 200°C (BEASLEY, 2002). Algumas soluções aquosas de MF retêm suas propriedades rodenticidas por pelo menos 12 meses (EISLER, 1995). O MF apresenta fórmula molecular CH_2FCOONa e massa molecular 100,02g/mol (BEASLEY, 2002).

2.1.2. Modo de ação e toxicidade de monofluoroacetato de sódio

O mecanismo de intoxicação atribuído às intoxicações por monofluoroacetato está relacionado à sua transformação em fluorocitrato, seu metabólito ativo. Uma vez absorvido, o MF se liga à Coenzima A (CoA) e forma fluoroacetil CoA no ambiente intramitocondrial ao invés de acetil CoA. Através da ação da citrato sintase, o fluoroacetato entra no ciclo para a formação de fluorocitrato (Figura 1), composto este que exerce bloqueio competitivo sobre a enzima aconitase (BARTLETT; BARRON, 1947; MORRISON; PETERS, 1954), impede a utilização do citrato que ficará acumulado, impossibilita a formação de NADH e FADH₂ e, conseqüentemente, a transferência de elétrons para a cadeia respiratória que tem grande importância na produção de ATP a partir de ADP.

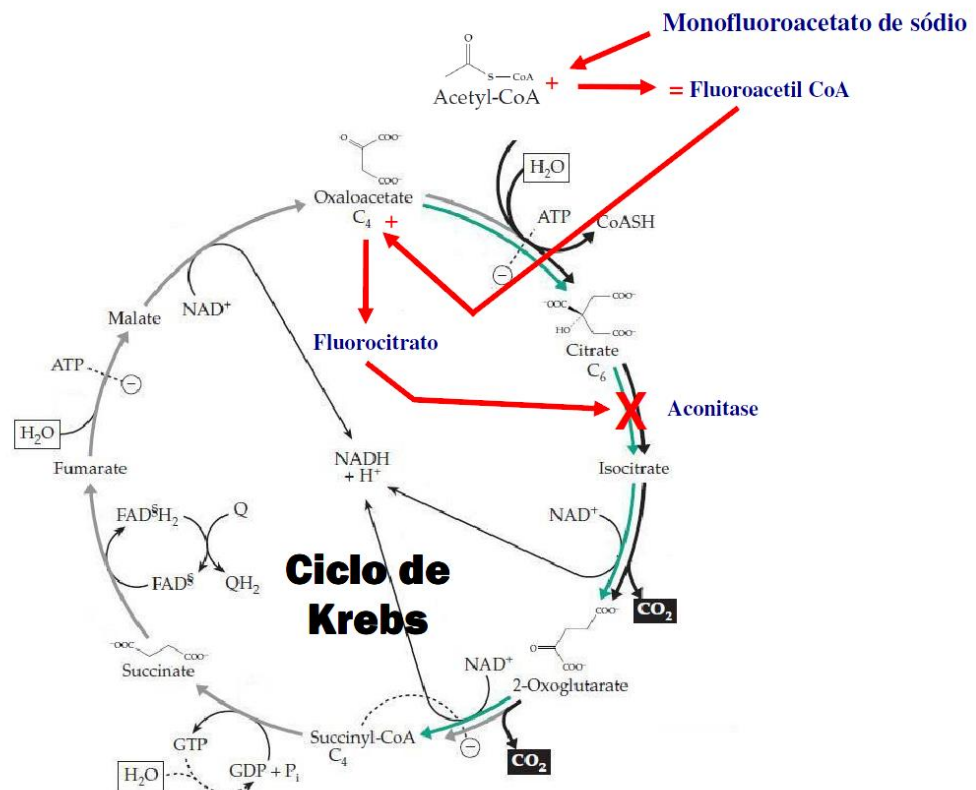


Figura 1. Ação do monofluoroacetato de sódio no ciclo de Krebs (PEIXOTO, 2010)

Com a diminuição nos níveis de ATP produzidos, os processos metabólicos que demandam grande energia no organismo são bloqueados, por exemplo: o sistema cardiovascular e nervoso. Os níveis de citrato encontrado nos tecidos de

animais intoxicados por MF se mostram elevados devido a sua não conversão em isocitrato, sobretudo no rim, sistema nervoso, baço e coração (BUFFA; PETERS, 1949; GAGNIN; MARAVALHAS, 1969; CLARKE 1991). O acúmulo desta substância nos tecidos pode levar a hipocalcemia devido à ação quelante de Ca^{2+} por citrato (GAL; PETERS; WAKELIN, 1956). Com o bloqueio do ciclo de Krebs induzido por esta intoxicação, ocorre redução do metabolismo da energia da cadeia de oxidação fosforilativa.

O MF é altamente tóxico para todas as espécies de animais (HUMPHREYS, 1988), porém seus efeitos tóxicos variam de acordo por espécie e sensibilidade individual. Há diferenças significativas nos períodos de latência da intoxicação até início dos sinais clínicos e o intervalo de tempo entre a ingestão de MF e a morte nas diversas espécies de vertebrados. Alguns animais morrem em poucos minutos e outros podem sobreviver por vários dias (McILROY, 1986). Diferentes respostas enzimáticas para a oxidação de acetato, indicando que sua toxicidade varia também de acordo com a necessidade do indivíduo em promover estas reações para produção de energia já foram observadas em cobaios e coelhos (BARTLETT; BARRON, 1947). As vias de intoxicação para o MF não parecem interferir na dose necessária para o aparecimento dos sintomas quando administradas por via intramuscular, oral, intravenosa, intraperitoneal ou por inalação (CHENOWETH; GILMAN, 1946; FOSS, 1948). A absorção cutânea em ovelhas que utilizam coleiras de proteção contra predadores, entretanto, não foi significativa para aparecimento dos sinais clínicos (BURNS; CONOLLY, 1995).

Em vertebrados, a temperatura influencia a toxicidade pelo fato de alterarem o metabolismo individual (EASTLAND; BEASOM, 1986). Veltman e Pinder (2001) observaram que para mesmas localidades, o uso de MF para controle de “brush-tail possums” (*Trichosurus vulpecula* ou Cusu-de-orelhas-grandes, marsupial nativo da Austrália) foi mais eficiente nos meses de temperaturas mais frias, reduzindo a população em 90%, em detrimento de 70% nos meses mais quentes. Por outro lado, Tokarnia et al. (2012) relataram que o calor excessivo pode precipitar os sintomas da intoxicação por MF, contido em plantas causadoras de “morte súbita”. Eastland e Beason (1986) mostram que estas variações podem se dar entre as espécies, uma vez que a toxicidade para guaxinins (*Procyon lotor*) é maior em temperaturas mais elevadas e para gambás (*Didelphis virginiana*), em

temperaturas mais baixas. Alguns autores conferem a variabilidade da toxidez do composto às diferentes características celulares, como permeabilidade de membrana e morfologia de organelas (BUFFA; PASQUALLI-RONCHETTI, 1977), já outros acreditam que se dê pela habilidade de conversão de fluoroacetato em flourocitrato (EISLER, 1995).

O acúmulo de MF em órgãos de animais submetidos a sua ingestão revelou pouca importância em intoxicações em humanos pelo consumo de carne, apesar de sua detecção em doses baixas até 96h após de sua morte (EASON et al., 1994). Aulerich, Ringer e Safronoff (1987) comprovaram através da administração de coelhos intoxicados por MF, que os riscos de intoxicação secundária por deposição nos músculos e vísceras em Mink (*Mustela vison*) é baixo e nenhum animal se intoxicou, mesmo que as carcaças compusessem 40% de sua dieta e sua sensibilidade seja das mais altas entre mamíferos (HORNSHAW; RINGER; AULERICH, 1986). Todavia, a predação de animais intoxicados por MF oferece riscos, visto que para diferentes espécies, suas taxas de acumulação podem variar de acordo com o tecido analisado e com a quantidade encontrada no trato gastrointestinal (MCILROY; GIFFORD, 1992).

2.1.3. Quadro clínico-patológico

Tradicionalmente as diferentes espécies animais são classificadas em quatro categorias, propostas por Chenoweth e Gilman (1946), em função do efeito provocado por MF. Entretanto, Peixoto et al. (2010) propuseram uma nova classificação dentro das mesmas categorias, adicionando dados recentes que não puderam ser obtidos no momento do trabalho de Chenoweth e Gilman. O Quadro 1 representa a classificação das diferentes espécies de mamíferos domésticos intoxicadas por monofluoroacetato. (CHENOWETH; GILMAN, 1946, revista por PEIXOTO et al., 2010).

Quadro 1. Relação entre o quadro clínico-patológico preponderante e as espécies de animais intoxicados por MF

Grupo	Sistema afetado	Espécies animais	Sintomatologia observada	Referências
I	Apenas cardiovascular	Ovinos	Alterações posturais, fraqueza, taquicardia, arritmia, pulso fraco, espasmos musculares, excitação e convulsão.	JENSEN et al., 1948
			Colapso circulatório, convulsões menores, tremores, hipersensibilidade	ANNISON et al., 1960
			Fraqueza muscular, incontinência fecal/urinária, agitação/hiperatividade, estresse respiratório e edema, tremores musculares, tetania e falha cardíaca (<i>causa mortis</i>)	SCHULTZ et al., 1982
			Taquicardia, arritmia, taquipnéia , respiração abdominal, perda de equilíbrio, andar cambaleante, postura de auto-auscultação, tremores musculares, apatia, relutância em mover-se, jugulares ingurgitadas e pulso venoso positivo, poliúria, estertores pulmonares, pescoço estendido com apoio da cabeça no solo e espuma saindo pelas narinas e boca, extensão de membros, movimentos de pedalagem, opstótono, nistagmo e respiração ofegante	PEIXOTO et al., 2010
		Bovinos	Letargia, fraqueza e tremores musculares, convulsões tônico-clônicas (movimentos de pedalagem)	ROBISON et al., 1970
			Taquicardia, jugulares ingurgitadas, pulso venoso positivo, respiração abdominal, ligeira perda de equilíbrio, andar cambaleante, postura de alto auscultação. Por vezes polaquiória, tremores musculares, sialorréia, veias da face ingurgitadas, miose. Decúbito lateral, extensão de membros, movimentos de pedalagem, respiração ofegante, opistótono, nistagmo e vocalização foram observados antes da morte de todos os animais.	NOGUEIRA et al., 2010

Quadro 1 (Continuação): Relação entre o quadro clínico-patológico preponderante e as espécies de animais intoxicados por MF

Grupo	Sistema afetado	Espécies animais	Sintomatologia observada	Referências		
		Caprinos	Animais morrem com sinais agudos de fibrilação ventricular, mas frequentemente apresentam sintomatologia similar a coelhos (Convulsões, opistótono, anóxia)	CHENOWETH; GILMAN, 1946		
			Fraqueza, colapso circulatório, taquipneia. Marcada queda na temperatura. Pulso célere e parada respiratória	FOSS, 1948		
		Equinos	Fraqueza, colapso circulatório, taquipneia e suor frio. Marcada queda na temperatura. Pulso célere e parada respiratória	FOSS, 1948		
		Coelhos	Convulsões, opistótono, dilatação pupilar e morte por fibrilação ventricular. Perturbações motoras e anóxia são observados na maioria dos casos.	CHENOWETH; GILMAN, 1946		
			Fraqueza muscular, dispneia e convulsões	FOSS, 1948		
		II	Cardiovascular e nervosa	Gatos	Vômito, salivação, taquipneia, dilatação pupilar, hiperexcitabilidade, convulsões tônico-clônicas e parada respiratória. Pode haver fibrilação ventricular.	CHENOWETH; GILMAN, 1946
					Vômitos e paresia seguidos de taquipneia, incontinência, incoordenação e incapacidade de movimentar os membros, olhos que reagem bruscamente à luz, reflexos bastante ativos, convulsões e espasmos musculares. Parada respiratória com batimento do coração mantido.	FOSS, 1948
					Vômitos, midríase bilateral, hipotermia, intensa agitação e hiperexcitabilidade, convulsão, taquipneia, dor abdominal, fezes pastosas, vocalização e prostração.	COLLICCHIO-ZUANAZE; SAKATE; CROCCI, 2006
Hipotermia, hiperemia de mucosas, desidratação, vômitos, midríase, hiperexcitação, epistaxe e convulsões tônicas.	RIBOLDI et al., 2014					
Suínos	Tremores, hiperexcitabilidade, intolerância ao exercício, violentas convulsões miotônicas que terminam em depressão respiratória. Fibrilação ventricular é observada ocasionalmente			CHENOWETH; GILMAN, 1946		

Quadro 1 (continuação): Relação entre o quadro clínico-patológico preponderante e as espécies de animais intoxicados por MF

Grupo	Sistema afetado	Espécies animais	Sintomatologia observada	Referências
II	Cardiovascular e nervosa	Equinos	Depressão, pulso periférico impalpável e fibrilação ventricular	CHENOWETH; GILMAN, 1946
III	Apenas nervosa	Cães	Hiperexcitabilidade, latidos, incoordenação, incontinência urinária e fecal, pupilas dilatadas, reflexos bruscos, animais correm incoordenados, com respiração dificultada e morrem de parada respiratória	FOSS, 1948
			Hiperexcitabilidade, convulsões, tremores, inquietação, respiração rápida e rasa, incontinência e diarreia, hipersalivação, tremores faciais, nistagmo, leve incoordenação, vocalização, atividades violentas, como correr a esmo e morder objetos e convulsões tetânicas antes da morte.	MCILROY, 1981
		Cobaios	Longas contínuas convulsões alternadas com estado de tremores. Morte precedida por parada respiratória sem acometimento cardíaco.	CHENOWETH; GILMAN, 1946
			Hiperexcitabilidade, convulsões tônicas alternadas com episódios de flacidez generalizada e dispneia.	FOSS, 1948
		Ratos	Tremores e hiperexcitabilidade. Convulsões miotônicas eram comuns em animais estimulados pelo movimento. Bradicardia e depressão foram observados de forma muito marcada no dia seguinte à administração nos animais que sobreviveram.	CHENOWETH; GILMAN, 1946
			Hiperexcitabilidade, convulsões tônicas alternadas com episódios de flacidez generalizada e dispneia.	FOSS, 1948
			Depressão, taquipneia, espasmos de musculatura abdominal seguidos de hiperatividade, dor abdominal. Convulsões com cianose, exaustão, respiração dificultada e dilatação pupilar precederam a morte dos animais.	EKEKEZE; OEHME, 1979;
			Pelos arrepiados, cianose, apatia, prostração, tremores musculares, vocalização, convulsões e movimentos de pedalagem.	PEIXOTO et al., 2011b

Quadro 1 (continuação): Relação entre o quadro clínico-patológico preponderante e as espécies de animais intoxicados por MF

Grupo	Sistema afetado	Espécies animais	Sintomatologia observada	Referências
III	Apenas nervosa	Camundongos	Hiperexcitabilidade, convulsões tônicas alternadas com episódios de flacidez generalizada e dispneia.	FOSS, 1948
		Hamsters	Tremores e hiperexcitabilidade. Convulsões miotônicas eram comuns em animais estimulados pelo movimento. Bradicardia e depressão foram observados de forma muito marcada no dia seguinte à administração nos animais que sobreviveram.	CHENOWETH; GILMAN, 1946
		Ratos	Tremores e hiperexcitabilidade. Convulsões miotônicas eram comuns em animais estimulados pelo movimento. Bradicardia e depressão foram observados de forma muito marcada no dia seguinte à administração nos animais que sobreviveram.	CHENOWETH; GILMAN, 1946
			Hiperexcitabilidade, convulsões tônicas alternadas com episódios de flacidez generalizada e dispneia.	FOSS, 1948
			Depressão, taquipneia, espasmos de musculatura abdominal seguidos de hiperatividade, dor abdominal. Convulsões com cianose, exaustão, respiração dificultada e dilatação pupilar precederam a morte dos animais.	EGEKEZE; OEHME, 1979;
			Pelos arrepiados, cianose, apatia, prostração, tremores musculares, vocalização, convulsões e movimentos de pedalagem.	PEIXOTO et al., 2011b
IV	Sintomatologia atípica	---	---	---

O grupo IV que era destinado a animais que apresentavam sintomatologia atípica (bradicardia e fraqueza), originalmente era composto por ratos e hamsters, entretanto, novos estudos levaram aos pesquisadores a classificá-los no grupo III junto com outros animais que apresentam sintomatologia nervosa (PEIXOTO et al., 2010).

O quadro clínico em humanos se caracteriza por aparecimento de anormalidades no sistema respiratório, nervoso, digestório, dinâmica eletrolítica e sobretudo no sistema cardiovascular. Sinais clínicos cardiovasculares comuns incluem: taquicardia, hipotensão e alterações no ritmo cardíaco que progridem para taquicardia e/ou fibrilação ventricular. Convulsões, paradas respiratórias e sangramento no trato digestório superior foram observadas mesmo com terapia de suporte agressiva com fluidoterapia, inotrópicos e correção hidroeletrólítica (CHI et al., 1999).

2.1.4. Plantas tóxicas que contêm monofluoroacetato

A semelhança entre o quadro clínico patológico provocado por MF e o observado nas intoxicações por plantas causadoras de morte súbita sugere que este é, de fato, o princípio ativo que determina a mortalidade dos animais. Peixoto et al. (2012) confirmaram esta hipótese através de similaridades nos efeitos terapêuticos da administração de acetamida para animais intoxicados por *P. marcgravii* e MF. Isolado de diversas plantas na África do Sul, como *Dichapetalum cymosum* ou “Gibflaar” (MARAIS, 1944; VICKERY; VICKERY, 1973), Austrália (OELRICHS; McEWAN, 1962; BARON et al., 1987) e Brasil (OLIVEIRA, 1963; KREBS et al., 1994; MORAES-MOREAU et al., 1995, CUNHA, 2008; LEE et al., 2012), MF é responsável pela morte de mais de 600.000 bovinos no país a cada ano (TOKARNIA et al., 2012) e foi isolado de *Palicourea marcgravii*, planta tóxica mais importante no Brasil, através de cromatografia de camada delgada (CCD) (OLIVEIRA, 1963, MORAES-MOREAU et al., 1995) e de espectroscopia por ressonância magnética nuclear flúor¹⁹(RMN¹⁹F) (KREBS et al., 1994, MORAES-MOREAU et al., 1995). O método de RMN¹⁹F foi também utilizado para isolamento de MF em *Tanaecium bilabiatum* (com nome anterior de *Arrabidea bilabiata*) (KREBS et al., 1994). Lee et al. (2012), detectaram MF em diversas

plantas do gênero *Amorimia* (*A. septentrionalis*, *A. rigida*, *A. aff. rigida*, *A. amazonica*, *A. camporum* e *A. exotropa*) e *Palicourea* (*P. aeneofusca* e *P. marcgravii*) através do método de *Cromatografia líquida de alta eficiência – Ionização química por pressão atmosférica – espectrometria de massa tandem (HPLC-APCI-MS)*. Em estudos posteriores, MF foi identificado em diversas outras espécies de *Palicourea* (*P. amapaenses*, *P. grandiflora*, *P. macarthurorum*, *nigricans*, *P. longiflora*, *P. aff longiflora*, *P. aff juruana*, *P. vacilans*), entretanto não há relatos de intoxicação natural ou experimental por todas estas plantas (COOK et al., 2014)

Embora o MF ainda não tenha sido detectado nas outras espécies de plantas brasileiras causadoras de “morte súbita”, *Fridericia elegans* (*Pseudocalymma elegans*), *Fridericia japurensis*, *Mascagnia divaricata* (*M. elegans*), é provável que esse composto também seja o princípio tóxico determinante dos sinais clínicos e da morte dos animais intoxicados por essas plantas.

2.1.5. Terapêutica da intoxicação por monofluoroacetato de sódio

Devido à alta fatalidade provocada pelo monofluoroacetato, tanto em forma sintética ou contido nas plantas causadoras de morte súbita, a terapêutica para os casos de intoxicação torna-se pouco efetiva para e de difícil realização para os médicos veterinários. (GOH et al., 2005, BURGER; FLECKNELL 1994).

A terapia na intoxicação por MF é pouco efetiva, entretanto, tratamentos de suporte e a administração de antídoto são opções para a desintoxicação (NOGUEIRA et al., 2011). Indução à êmese, lavagens gástricas, uso de adsorventes (colestipol, carvão ativado, resinas de troca iônica) são medidas que podem ser tomadas imediatamente após a ingestão (OSWEILER, 1996, NORRIS et al., 2000), entretanto, na literatura são escassos os dados confiáveis acerca da eficácia desses métodos (GOH et al., 2005), uma vez que frente a uma administração de doses altas de MF, estes são ineficazes e os animais morrem (WICKSTROM et al., 1998).

2.1.6. Diagnóstico, prognóstico e diagnóstico diferencial

Na intoxicação por MF, o histórico de ingestão, achados clínicos e presença da substância através de exames toxicológicos são utilizados como ferramentas para realização do diagnóstico (NOGUEIRA et al., 2011). Por ser inespecífica na maioria dos casos, a sintomatologia da intoxicação não é determinante para o diagnóstico preciso e existem poucos estudos relacionados ao diagnóstico (CHI et al., 1996, 1999; O'HAGAN 2004). Os sinais clínicos da intoxicação por MF, que usualmente ocorrem de forma aguda, ocorrem, de 30 minutos a duas horas após a ingestão da substância. A forma subaguda e crônica da intoxicação podem ocorrer em qualquer ruminante, porém são mais frequentes em ovinos, por ingestão de plantas tóxicas (OLIVER; KING; MEAD, 1979) e por estes se mostrarem mais resistentes à intoxicação (PEIXOTO, 2010).

A dosagem dos níveis séricos de citrato, cálcio, glicose e glicogênio são alternativas para a determinação da intoxicação por MF, uma vez que suas concentrações estão relacionadas às alterações metabólicas decorrentes da presença de monofluoroacetato no organismo animal (SCHULTZ et al., 1982).

Para diagnóstico definitivo da intoxicação devem ser realizadas análises toxicológicas para identificação da substância. Métodos qualitativos de detecção são os mais comuns e foram desenvolvidos principalmente para detecção em iscas líquidas, amostras de solo, sangue, urina, tecidos e plantas tóxicas (SAKAI; MIYAHARA 1981).

A DHV (Figuras 2 e 3) é de grande valor no diagnóstico de intoxicação por MF nos animais e deve ser investigada sempre que houver suspeita de intoxicação por MF (NOGUEIRA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2010; PEIXOTO, 2011a), porém sua identificação nos exames histopatológicos deve excluir completamente a possibilidade de processos autolíticos que frequentemente acometem os túbulos uriníferos. De acordo com Peixoto et al. (2011a), quando trata-se de materiais recém colhidos, a diferenciação morfológica dos achados patológicos e de fenômenos pós-mortais é possível ser feita com base nas seguintes alterações: (a) a lesão é extremamente delimitada (afeta somente os túbulos distais); (b) não há sinais de autólise e as células não estão afastadas da membrana basal (“soltas”); e (c) a tumefação é muito mais acentuada de forma que as células afetadas tornam-se

praticamente vesículas que exibem um núcleo marcadamente picnótico, diferente do que ocorre nos fenômenos autolíticos. Contudo, a DHV não foi observada em 1/3 dos bovinos intoxicados (TOKARNIA; DÖBEREINER, 1986) e sua ausência não exclui a possibilidade de intoxicação por monofluoroacetato ou plantas causadoras de morte súbita.

Devido à rápida instalação dos sinais clínicos e seu agravamento na intoxicação por MF, o prognóstico é desfavorável ao animal e varia de ruim a grave de acordo com a quantidade do composto tóxico ingerida e gravidade de sinais clínicos. Contudo, há melhora do prognóstico quando o tratamento com acetamida ou bicarbonato de sódio é instituído precocemente (PARTON, 2006). Em humanos, a mortalidade pode chegar a 40% (NORRIS et al., 2000)

O diagnóstico diferencial da intoxicação por MF deve ser feito com base em diversas outras doenças de morte súbita, dentre estas a “falling disease”, provocada pela deficiência de cobre, porém esta patologia tende a mostrar sinais clínicos progressivos de acromotriquia, anemia e, eventualmente, outros sintomas. A marcada hemossiderose esplênica e a presença de degeneração hidrópico-vacuolar são capazes de permitir a distinção entre os dois casos. Também como possível diagnóstico diferencial, devemos nos atentar à possibilidade de acidente ofídico, assunto já amplamente discutido por Tokarnia e Peixoto (2006), carbúnculo hemático e intoxicação por plantas cianogênicas. Porém, neste último caso, os sintomas são aparentes logo após a ingestão da planta devido à rápida absorção do cianeto e os achados histopatológicos não são específicos e, por isso, de relevância não significativa.

O diagnóstico diferencial entre a intoxicação por MF e plantas que causam “morte súbita”, deve ser realizado, sobretudo, com base nos dados epidemiológicos, uma vez que não há quaisquer diferenças clínico-patológicas entre essas duas condições. Devemos lembrar, entretanto que, ao contrário do que ocorre em bovinos, a intoxicação em ovinos por plantas desse grupo, sob condições naturais, é pouco comum. São descritos apenas alguns surtos de intoxicação por *Amorimia rigida* na Paraíba (VASCONCELOS et al., 2008) e por *Amorimia exotropica* no Rio Grande do Sul (BANDARRA et al., 2005). Embora a intoxicação criminosa por MF deva ser considerada em casos de morte súbita de ovinos e bovinos, acreditamos que sua ocorrência seria menos provável, pois a comercialização desse

composto é proibida no país (BRASIL, 1997). Contudo, sabe-se que este composto ainda é ilegalmente comercializado por ambulantes (APEVISA, 2009) e que, se armazenado sob condições adequadas, a sua toxidez é mantida por décadas (EISLER, 1995).

Em cães e gatos, o envenenamento por MF deve ser diferenciado da intoxicação criminosa por outros compostos como carbamato, organofosforado, estricnina e organoclorado (O'HAGAN, 2004), o que pode ser feito com base nos aspectos clínico-patológicos e, em caso de dúvida, pela análise toxicológica de tecidos desses animais.

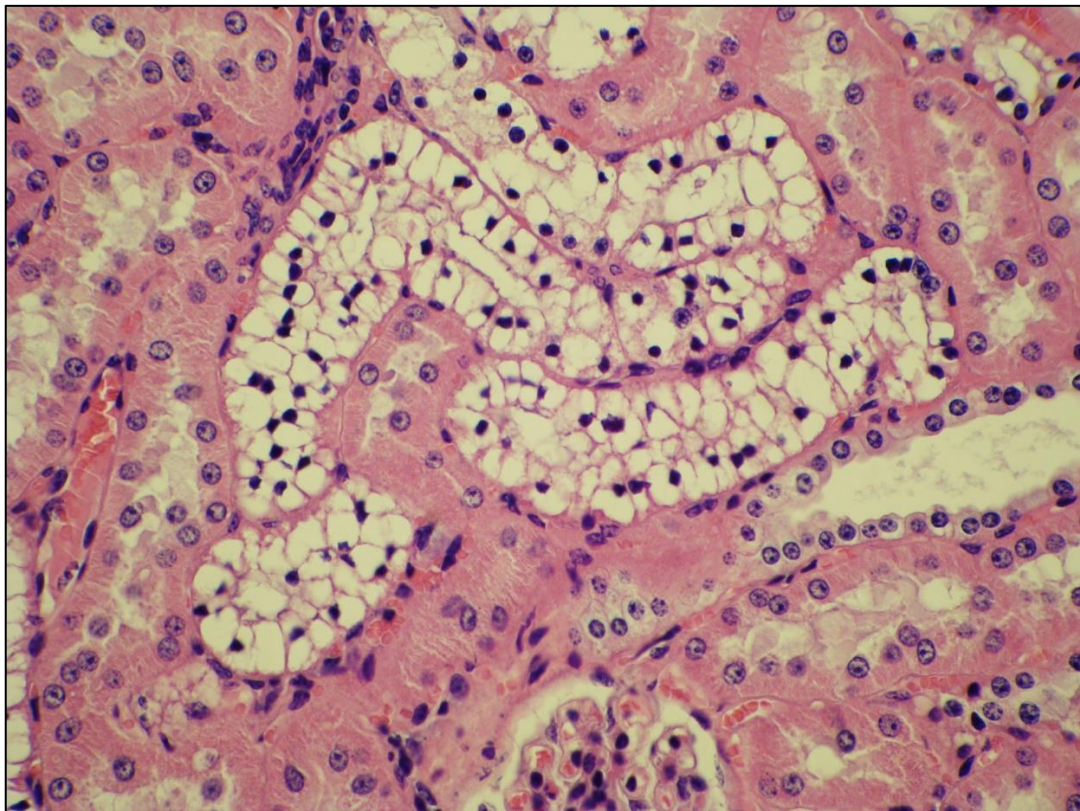


Figura 2: DHV das células epiteliais dos túbulos uriníferos contorcidos distais associada à cariopícnose. Bovino intoxicado por MF (1,0 mg/kg). Objetiva de 25x. (NOGUEIRA, 2009)

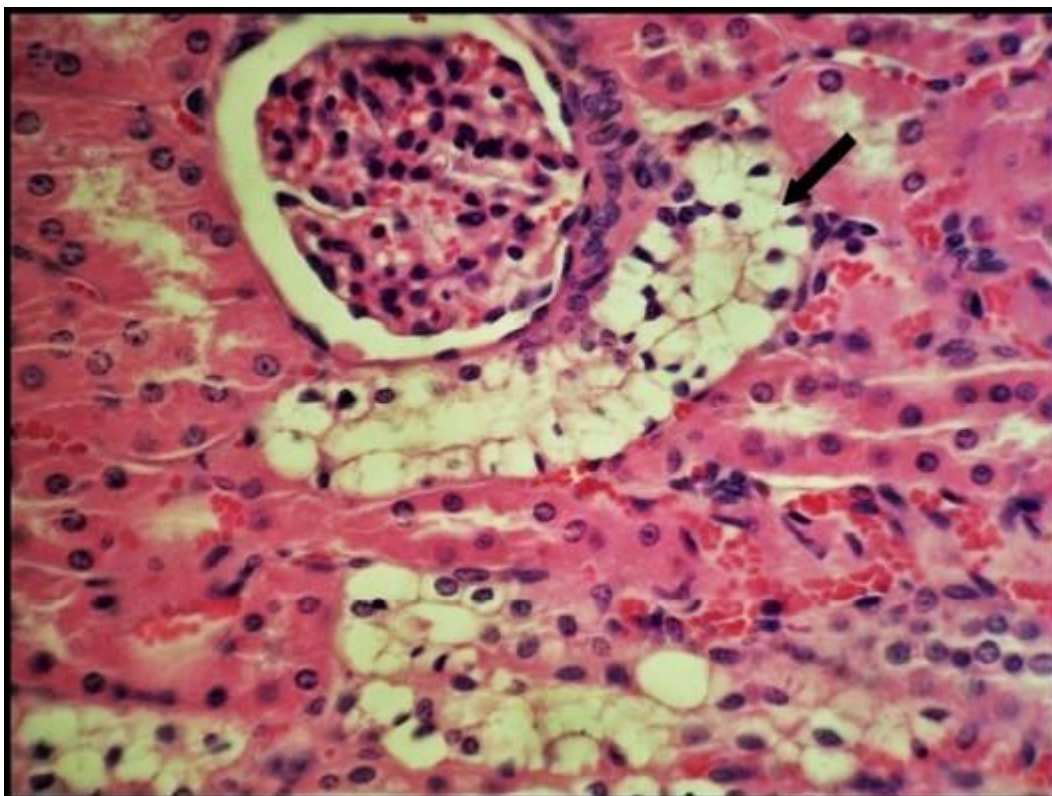


Figura 3: Degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos uriníferos contornados distais associada à cariopícnose (seta). Ovino intoxicado por MF (0,2 mg/kg/dia por 6 dias). Objetiva de 25x. (PEIXOTO, 2010)

2.2 PRINCIPAIS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE LESÃO CARDÍACA

Os principais marcadores de lesão miocárdica estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Antígenos utilizados na detecção de lesões cardíacas, sua origem e o tipo de marcação celular

ANTÍGENO	ORIGEM	TIPO DE MARCAÇÃO NA LESÃO CELULAR	REFERÊNCIA
C5b-9	Plasmática	Positiva	CAMPOBASSO et al., 2008; ORTMANN; PFEIFFER; BRINKMANN, 2000
C4d	Plasmática	Positiva	JENKINS et al., 2010; CHANTRANUWAT et al., 2004
C9	Plasmática	Positiva	JENKINS et al., 2010; OFFERMAN et al., 2000; SILVA et al., 2002; DORAN et al., 1996
Fibronectina	Plasmática	Positiva	CAMPOBASSO et al., 2008; SILVA et al., 2002; ORTMANN; PFEIFFER; BRINKMANN, 2000; HU; CHEN; ZHU, 1996
Mioglobina	Celular	Negativa	CAMPOBASSO et al., 2008; SILVA et al., 2002; ORTMANN; PFEIFFER; BRINKMANN, 2000
CK-MB	Celular	Negativa	ADAMS; ABENDDSCHHEIN; JAFFE; 1993
H-FABP	Celular	Negativa	KLEINE et al., 1993
cTnI	Celular	Negativa	CAMPOBASSO et al., 2008; FISHBEIN et al., 2003
cTnT	Celular	Negativa	JENKINS et al., 2010; SILVA et al., 2002; FISHBEIN et al., 2003; ORTMANN; PFEIFFER; BRINKMANN, 2000
cTnC	Celular	Negativa	PAVARINI et al., 2012; BANDINELLI et al., 2014

Segundo Adams, Abendschein e Jaffe (1993), para que um marcador seja efetivo para detectar lesões cardíacas, este deve obedecer a seguintes parâmetros: a) ser encontrado em alta concentração miocárdio, b) não ser encontrado em outros tecidos, mesmo que em baixas concentrações e apenas em condições patológicas, c) ser liberado rapidamente na circulação no momento da lesão, d) obedecer proporção entre liberação e extensão da lesão, e) persistir no plasma por algumas horas para

que proporcionem um tempo hábil de diagnóstico, porém não tão longo que impeçam diagnóstico de lesões recorrentes.

Diversos fatores determinam estas características para cada marcador, dentre estas: tamanho (quanto menor a molécula, mais rápido se perde para o plasma), localização celular (proteínas citosólicas se perdem mais rápido que proteínas estruturais que dependem de lesão ao sarcolema para que fiquem livres no plasma), solubilidade (algumas proteínas contráteis de baixa solubilidade demoram a se mover do miocárdio), taxa de liberação (algumas proteínas se degradam após a liberação e a quantidade perdida no miocárdio e a quantidade detectada em níveis séricos), clearance (moléculas com meia vida curta são ideais para detecção em processos seriados, quando a coleta pode ser feita com maior frequência e são igualmente úteis para detectar processos recorrentes, em detrimento das moléculas com meia-vida mais longa), especificidade pelo miocárdio (algumas macromoléculas cardíacas são abundantes em musculatura esquelética, especialmente em condições patológicas), especificidade por lesão irreversível (pequenas liberações destas proteínas na circulação podem tornar valores de referência muito variáveis, predispondo a análises errôneas, nas quais apenas se considera que há liberação destas proteínas em condições irreversíveis) e detectabilidade (geralmente, moléculas com concentrações baixas na circulação fornecem maior segurança diagnóstica).

Lagrand et al. (1997) sugerem que a proteína **C-reativa** pode ativar o sistema complemento em humanos com infarto agudo do miocárdio (IAM). Dentre os produtos da ativação do complemento, destacam-se **C4d** e **C5b-9** (YASOJIMA; SCHWAB; McGEER, 1998).

Na patogênese da resposta inflamatória ao dano tecidual, o sistema complemento tem duas funções, formação de anafilatoxinas e substâncias quimiotáticas, que causam contração, vazamento e exocitose do endotélio vascular, e promovem a adesão de neutrófilos. A segunda função é mediar a lise celular, opsonização, e, conseqüentemente, a fagocitose (ENTMAN et al., 1992).

Além de dar início à fagocitose o **sistema complemento** exerce uma atividade lítica direta através do fator **C9** (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1994), que é parte do complexo de ataque à membrana (YASOJIMA; SCHWAB;

McGEER, 1998), formando poros transmembrana, que conduzirão a célula alvo à lise osmótica (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1994).

Em muitos casos em que o **IAM** ocorre de maneira muito precoce, avaliar os danos ao miocárdio apenas com a coloração rotineira de hematoxilina e eosina pode se tornar uma tarefa difícil para os patologistas. Desta maneira muitos trabalhos têm sugerido a utilização desses fatores do sistema complemento, assim como os marcadores celulares para a identificação de necrose celular nos casos em que a morte do paciente ocorreu antes da ocorrência de infiltração inflamatória no local da lesão (CAMPOBASSO et al., 2008)

Até meados dos anos 1990, o marcador de eleição para detecção de **IAM** era a **creatina-kinase-MB**. Esta enzima possui a função de transferir uma molécula de fosfato do ATP para a creatina, tornando-a creatina-fosfato, gerando grande quantidade de energia e é encontrada em diversos tecidos como diferentes isoformas, de acordo com as subunidades ligadas à enzima, que pode ser M ou B. Moléculas de creatina-kinase que apresentam apenas uma das subunidades são consideradas enzimaticamente inativas (ADAMS; ABENDDSCHEIN; JAFFE; 1993). **CK-BB** é abundante no cérebro, **CK-MM**, na musculatura estriada esquelética e **CK-MB** no coração (TRASK; BILLADELLO, 1990). Após lesão miocárdica, níveis de CK-MB elevados foram observados em humanos com hipertensão, doença coronariana e hipertrofia ventricular esquerda (INGWALL et al., 1985), entretanto, no soro de pacientes com IAM estes demoram a ficar elevados, isso só ocorre algumas horas após o aparecimento da dor, e o diagnóstico passa a depender de alterações eletrocardiográficas que são inconclusivas em até 40% dos pacientes (GODOY; BRAILE; NETO, 1998).

Proteínas ligadoras de ácidos graxos são moléculas carreadoras de substâncias lipofílicas, presentes em todo o organismo (GLATZ; VAN DER VUSSE, 1990). A liberação deste composto em sua isoforma cardíaca (H-FABP) para a circulação foi observada em casos de IAM em humanos (KLEINE et al., 1992). O uso de anticorpos **anti-H-FABP** utilizado por Kleine et al. (1993) demonstra através de ensaios imuno-histoquímicos que estas proteínas são perdidas em menos de 4 horas após instalação da lesão cardíaca e permitem a visualização mesmo em casos que a coloração rotineira não é capaz.

Além dos fatores do **sistema complemento**, **CK-MB** e **H-FABP**, as **troponinas cardíacas** (T, C e I) têm sido utilizadas como marcadores de lesão ao miocárdio. Ela está presente nos miócitos viáveis, ou seja, nos não necróticos (JENKINS et al., 2010; PAVARINI et al., 2012). Porém um estudo realizado por Fishbein et al. (2003) demonstraram que a troponina T (cTnT) revelou resultados mais impressionantes do que os da troponina I (cTnI), sendo útil também na marcação de células cardíacas de rato, cão e porco, que foram utilizados como modelos experimentais.

A **fibronectina** é uma glicoproteína presente no plasma e na matriz extracelular que tende a se acumular em células cardíacas lesionadas. Durante a isquemia ela extravasa dos capilares e da matriz extracelular para o interior de miócitos lesionados. Experimentalmente observou-se que 30 a 60 minutos após oclusão coronária já havia reação positiva para fibronectina (HU; CHEN; ZHU, 1996) que não é afetada pela autólise (CAMPOBASSO et al., 2008).

A **mioglobina** é uma proteína que transporta oxigênio e está presente nos músculos esquelético e cardíaco, e por isso, a sua quantidade é abundante em todas as fibras musculares, incluindo musculaturas lisa, esquelética e cardíaca. Desta maneira, caso ocorra algum dano muscular ou, mesmo, insuficiência renal crônica, os níveis de mioglobina no soro podem estar aumentados. Contudo, devido a sua inespecificidade cardíaca, o diagnóstico diferencial torna-se um problema (KENT, 1982).

Campobasso et al. (2008) sugerem a utilização de um painel imuno-histoquímico para a detecção de lesões precoces em miocárdios suspeitos de lesão isquêmica. Desse modo, visa a diminuição de equívocos de interpretação com relação à especificidade e sensibilidade dos diferentes anticorpos testados para estabelecer com maior precisão o início da morte celular em conjunto com as alterações macro e microscópicas de rotina. Entretanto neste estudo os marcadores que expressam marcação negativa na lesão puderam detectar presença de lesões antes daqueles que expressam marcação positiva.

Ortmann (2000) descreve que a detecção da depleção dos antígenos celulares começa antes da deposição de antígenos plasmáticos.

2.3. Troponina

2.3.1. Estrutura e função

A contração muscular ocorre por meio de encurtamentos produzidos nos miócitos, mais precisamente nos sarcômeros, que são compostos de diversas miofibrilas dispostas em arranjos hexagonais de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina (HUXLEY, 1961) (Figura 4).

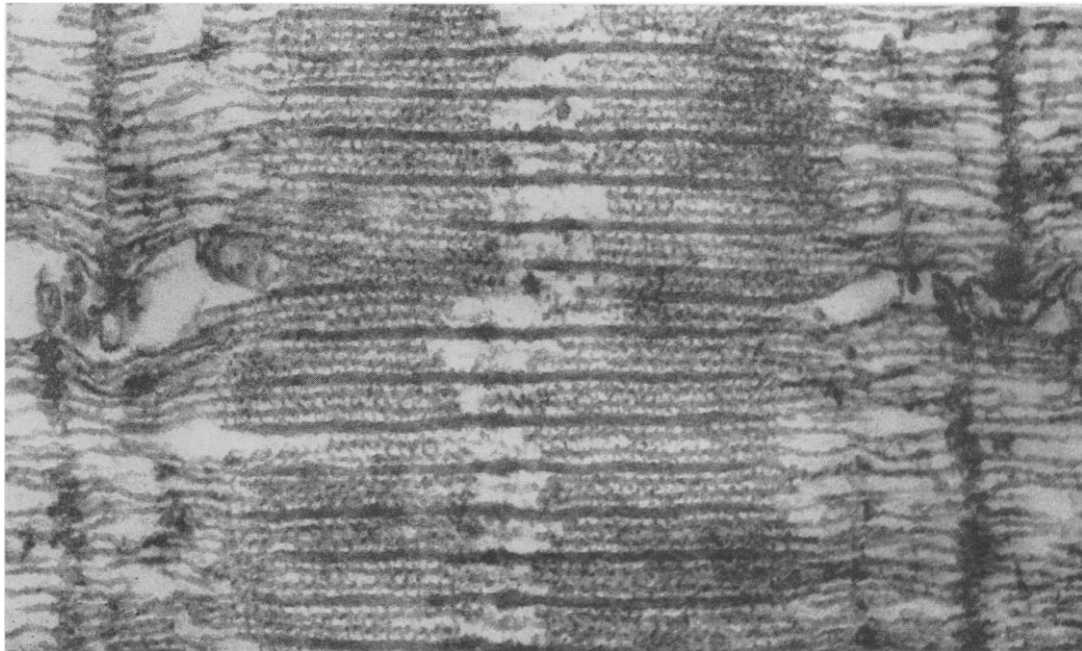


Figura 4: Arranjos em filamentos finos e grossos em músculo psoas de coelho. 150.000x (HUXLEY, 1961)

O filamento fino é composto de actina (dispostas em fileiras duplas de unidades monoméricas de 5nm que formam uma dupla hélice), tropomiosina (dupla hélice proteica que se “enrola” na dupla hélice de actina) e pelo complexo troponina, composto por proteínas reguladoras que controlam a interação Ca^{2+} dependente entre os filamentos de actina e miosina e são responsáveis pelo ciclo dinâmico de relaxamento e contração muscular (Figura 5). Reconhecem-se três troponinas cardíacas distintas, designadas pelas letras C (cTnC), T (cTnT) e I (cTnI) (MARTINS, 2009). A cTnC promove a ligação com Ca^{2+} em sua porção N-terminal, cTnI é responsável pela inibição da ligação entre actina e miosina e cTnT

se une à porção ligante da tropomiosina e às outras subunidades. A cada sete monômeros de actina, há um complexo troponina (PARMACEK; SOLARO, 2004).

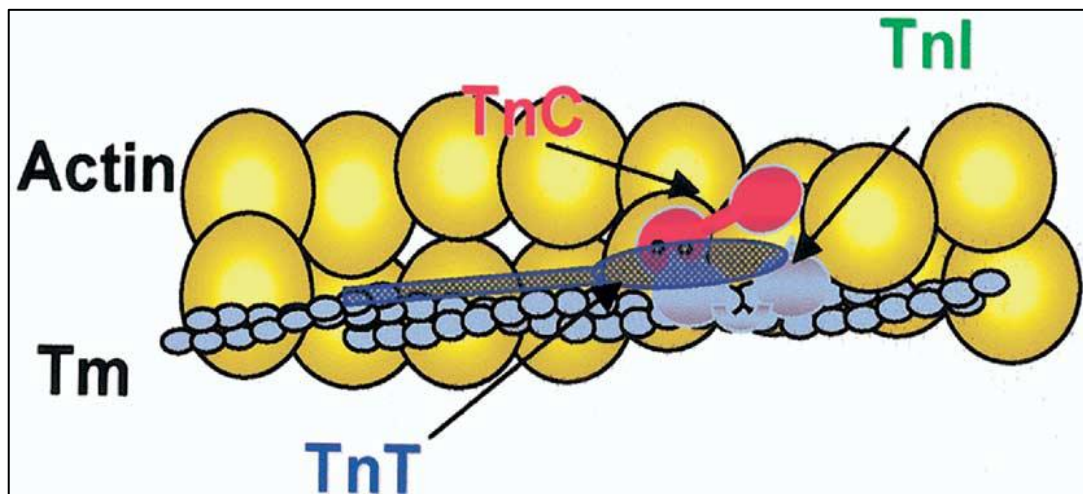


Figura 5: Estrutura das troponinas (PARMACEK; SOLARO, 2004)

As moléculas apresentam-se em conformações distintas durante o relaxamento e contração. Na primeira, ocorre um estado de não-ligação entre o Ca^{2+} e cTnC e a porção cTnI está fortemente ligada à actina, colocando a tropomiosina em posição de bloqueio para a interação entre actina e miosina. Adicionalmente, nesta conformação a porção N-terminal da cTnT também impede a movimentação da tropomiosina de sua posição bloqueadora. No momento da sístole, os íons Ca^{2+} são liberados no espaço dos miofilamentos e sua ligação com cTnC expõe a superfície do lobo N-terminal que é suficiente para atrair a cTnI e mover sua posição, invertendo sua atividade inibitória e liberando-a da actina. Isto resulta em diversas interações entre as proteínas que libera a tropomiosina e permite a ligação entre actina e miosina para a contração (ADAMS; ABENDSCHEIN; JAFFE, 1993; PARMACEK; SOLARO, 2004).

As troponinas cardíacas são isoformas das troponinas codificadas por gens específicos. A cTnC é semelhante em 70% de sua estrutura à troponina esquelética C (sTnC) e estas diferenças se dão em três locais diferentes: uma porção estrutural sem função conhecida; uma porção ligante de cálcio com baixa afinidade que é funcional no esquelético, mas não no cardíaco e um terceiro em um ligante de

cálcio que promove a interação entre cTnC e cTnI. Ao contrário de cTnI e cTnT, não foram encontradas isoformas fetais de cTnC. Durante o desenvolvimento fetal, a cTnC é expressa em músculos esqueléticos de rápida e lenta contração e também em músculos cardíacos, porém na vida adulta é presente no cardíaco e no esquelético de lenta contração, o que compromete seu uso como marcador bioquímico para lesões cardíacas (PARMACEK; LEIDEN, 1989). Os genes codificadores da cTnC são idênticos no músculo cardíaco e esquelético, porém os que codificam as cTnT e cTnI são diferentes, o que facilitou o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM) devido à utilização de anticorpos monoclonais de reatividade cruzada extremamente baixa (GODOY et al., 1998).

As troponinas, assim como a tropomiosina, estão envolvidas na contratilidade como proteína moduladora, pois quem realmente exerce atividade contrátil são a actina e a miosina (AIRES, 1999) e são alvos importantes para a utilização de drogas inotrópicas que aumentam a quantidade de Ca^{2+} intracelular ou a sensibilidade dos miofilamentos para estes íons (HAIKALA et al., 1995)

2.3.2. Comportamento na lesão celular

Devido ao fato de que a morte celular não ocorre imediatamente após o estímulo lesivo, é relatado que as alterações microscópicas visíveis pela coloração de rotina não são evidentes até 6 horas decorridas do estímulo inicial. Isto significa que para serem vistas lesões de coagulação das miofibras, perda de estriações, picnose, cariólise e aporte de células inflamatórias, o indivíduo deve sobreviver a pelo menos 6 horas para que a morte seja detectada sem o auxílio de técnicas imuno-histoquímicas para o diagnóstico (CAMPOBASSO et al., 2008).

Por volta de 4 a 6 horas após lesão ou necrose aguda do miocárdio há um aumento das concentrações séricas de cTnI e cTnT (NELSON; COUTO, 2006; JENKINS et al., 2010). A cinética de liberação das troponinas foi estudada por Katus et al. (1991) e estes observaram a presença de quantidades destas moléculas que não se apresentavam ligadas à estrutura contrátil, e sim em sua forma solúvel, constituindo um reservatório citosólico destas proteínas.

Em pacientes humanos, a detecção de troponinas séricas tem direta relação com o grau de reperfusão dos infartos, podendo apresentar picos nas concentrações

de 14 horas após a lesão quando a reperfusão ocorre antes de 3,5h da instalação da dor torácica e em casos de oclusão total do fluxo para o IAM, estes níveis podem se manter estáveis até 120h do início das lesões (KATUS et al., 1991). Fishbein et al. (2003) foram capazes de detectar a perda de expressão para o anticorpo anti-troponina em infartos induzidos em modelos experimentais (cães, porcos e ratos) com apenas 30 minutos a partir do estabelecimento da lesão.

Ortmann, Pfeiffer e Brinkmann (2000) descreveram, em humanos, intensa perda de marcação imuno-histoquímica para cTnC em casos de IAM e leve a intensa perda em casos nos quais a *causa-mortis* foi associada ao mau funcionamento do sistema cardiovascular (arritmias, cardiomiopatias, trombose e arteriosclerose). Tal fato foi observado também por Campobasso et al. (2008) quando a perda de expressão imuno-histoquímica para anticorpo anti- cTnI foi detectada em humanos com diagnóstico obscuro e com histórico apenas de “encontrado morto em casa”.

A cTnC apresenta maior sensibilidade se comparada à cTnT nos casos de lesões em cardiomiócitos de humanos e baixa especificidade para detecção de lesão cardíaca em ensaios bioquímicos, uma vez que essa estrutura presente na musculatura esquelética é muito similar com a da cardíaca (SCHREIER; KEDES; GAHLMANN, 1990).

Em humanos, mutações nos gens que codificam as troponinas podem levar ao aparecimento de cardiomiopatia dilatada em vários indivíduos de uma mesma família. Estas mutações já foram identificadas no gen TNNT2, responsável pela codificação de cTnT (STEFANELLI et al., 2004).

2.3.3. Troponinas em animais

Başbuğan, Ağaoğlu e Yüksek (2010) determinaram as concentrações de séricas de cTnI em bovinos normais como menores que 0,23ng/ml, em ovinos menores que 0,21ng/ml e, em caprinos menores que 0.24ng/ml. Dosagens séricas para detecção de lesões miocárdicas foram capazes de detectar níveis elevados de troponina em ovinos com deficiência clínica ou subclínica de Selênio (ATAOLLAHI; MOHRI; SEIFI, 2013), febre aftosa (ASLANI; MOHRI; MOVASSAGHI, 2013); em bovinos intoxicados por monensina (VARGA et al.,

2009), com febre aftosa (TUNCA et al., 2008) e com pericardite (MELLANBY et al., 2007); em equinos, elevações séricas de cTnI foram observadas em animais que sofreram necrose miocárdica (SCHWARZWALD; HARDY; BUCCELLATO, 2003) e após exercício em alguns animais testados por Yonezawa et al. (2010), entretanto os níveis voltaram ao normal em 24h após o estresse. Os autores acreditam que esta alteração está ligada à perda do reservatório citosólico de troponina em decorrência do estresse oxidativo ocasionado por espécies reativas do oxigênio que levam a alterações de permeabilidade de membrana nos cardiomiócitos. De forma similar, Durando et al. (2006) não encontraram diferenças significativas em coletas feitas antes, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após o exercício. Estudos também foram conduzidos em animais de companhia e os ensaios com troponinas para detecção de lesão cardíaca foram eficazes em cães com cardiomiopatia dilatada e doença valvular de mitral (OYAMA; SISSON, 2004).

A perda de imunorreatividade para cTnI foi observada por Tunca et al. (2008) em bovinos jovens com febre aftosa. Neste estudo, observou-se que, não somente os cardiomiócitos severamente necrosados (com cariorrexia, perda de estriações e aporte de células inflamatórias fagocíticas) apresentavam pouca ou nenhuma imunomarcção, mas também algumas células com hipereosinofilia e sem sinais clássicos de necrose ou degeneração.

Recentemente foi possível detectar perda de imunomarcção para o anticorpo anti-cTnC em lesões cardíacas decorrentes de intoxicação por *Amorimia exotropa* em bovinos do sul do Brasil (PAVARINI et al., 2012; BANDINELLI et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica do Projeto Sanidade Animal, Anexo I do Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.2. Animais e amostras de tecidos

Foram utilizados fragmentos de coração, emblocados em parafina, de cinco ovinos e seis bovinos intoxicados previamente, por via oral, com MF (NOGUEIRA et al., 2010; PEIXOTO, et al., 2010). Nestes estudos, três bovinos receberam doses únicas de 0,5 mg/kg e, os demais, 1,0 mg/kg de MF (Sigma-Aldrich Co[†] - Figura 6). Um ovino recebeu dose única de 0,5 mg/kg, outros dois, 1,0 mg/kg, um animal foi intoxicado com doses subletais de 0,1 mg/kg/dia, por quatro dias, e outro, 0,2 mg/kg/dia por seis dias. Os bovinos e ovinos eram de ambos os sexos, raças e idades variadas.



Figura 6: Monofluoroacetato de sódio utilizado nos experimentos (PEIXOTO, 2010)

3.3. Confecção das lâminas

Seções histológicas dos corações dos bovinos e ovinos intoxicados, dos controles positivos e negativos para lesão cardíaca foram obtidas em cortes duplicados e de forma seriada, dos quais um foi destinado à coloração rotineira de HE e outro em lâmina silanizada para a técnica de imuno-histoquímica.

3.4. Imuno-histoquímica com anticorpo anti-cTnC

As seções histológicas foram desparafinadas em xilol, reidratados em álcool e submersas em duas soluções de peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 minutos cada para bloqueio de peroxidases endógenas e então lavadas com tampão fosfato

(PBS) por 2 minutos. Logo após foram levadas ao banho-maria em solução de tampão citrato (pH = 6), onde ficaram por 30 minutos a temperatura de 98°C para reativação dos sítios antigênicos. Para bloqueio de reações inespecíficas, foi utilizado leite desnatado a 5% (Molico® - Ind. Bras.). Os cortes foram incubados “overnight” com o anticorpo anti-cTnC (Novo Castra) na diluição de 1:100. Após incubação, estes foram lavados com tampão fosfato e utilizaram-se os componentes Complemento (10 minutos) e Conjugado HRP (15 minutos) do kit Spring® REVEAL. As seções foram coradas com diaminobenzina (DAB), contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas para visualização em microscópio ótico. Utilizamos para controles coração de bovinos e ovinos com e sem lesão cardíaca.

3.5. Avaliação das lâminas

As secções histológicas foram avaliadas em microscópio ótico, sempre comparadas aos controles positivos (bovinos com necrose cardíaca causada pela intoxicação por *Palicourea juruana* e ovinos intoxicados de forma aguda por Monensina) e aos controles negativos (bovinos e ovinos abatidos para consumo sem qualquer condição clínica para o sistema cardiovascular). Para tal, também utilizamos o controle interno positivo e negativo, no qual os cardiomiócitos não lesados marcam positivamente para o anticorpo anti- cTnC e os demais tecidos que não expressam esta proteína são negativos (tecido conjuntivo, células inflamatórias, parede de grandes vasos).

Ao momento da avaliação microscópica (Nikon® Eclipse E200) e a partir da suspeita de aparecimento entre áreas com hipereosinofilia de cardiomiócitos na coloração HE, as seções submetidas ao exame imuno-histoquímico eram avaliadas em mesmo campo e com mesmo aumento e registradas através de fotomicrografia com câmera própria para microscópios (Moticam 2500 5.0 megapixels) e capturada pelo software Motic Cam 2.0.

A imunomarcção foi graduada como (+) discreta; + leve; ++ moderada; ++(+) acentuada ou +++ muito acentuada.

4. RESULTADOS

4.1. Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos

4.1.1. Bovinos

O exame histológico revelou, no coração dos bovinos, grupos de cardiomiócitos e células isoladas com aumento da eosinofilia citoplasmática e ausência de estriação das fibras musculares (Figuras 7 e 9). Nos Bovinos 31213 e 31214, algumas células encontravam-se retraídas e, ocasionalmente, com núcleos picnóticos ou fragmentados. Havia ainda, pequenas áreas com infiltrado inflamatório linfocitário.

No exame imuno-histoquímico, verificou-se redução dos níveis de expressão da cTnC no citoplasma de grupos de fibras musculares. Diminuição significativa na imunoreatividade ocorreu, sobretudo, em cardiomiócitos que apresentavam, no exame histopatológico, aumento da eosinofilia citoplasmática ou nas células com características histológicas de morte celular à avaliação da microscopia de luz (Figuras 8 e 10). Nos miócitos remanescentes e intactos dos animais intoxicados e daqueles utilizados como controle negativo, observou-se marcada imunoreatividade. Os resultados comparativos entre tempo de administração, evolução e achados histopatológicos na coloração de HE e IHQ em bovinos encontram-se no quadro 3.

4.1.2. Ovinos

A avaliação microscópica revelou, no coração dos ovinos, cardiomiócitos em grupos ou isolados com aumento da eosinofilia citoplasmática e aspecto homogêneo (Figuras 11 e 13). No Ovino 31266, havia áreas com citoplasmólise de fibras musculares, associada à cariopicnose e cariólise. Adicionalmente, eram observados pequenos focos com influxo de macrófagos, que fagocitavam fibras necróticas.

No exame imuno-histoquímico, verificou-se redução dos níveis de expressão da cTnC no citoplasma de grupos de fibras musculares. Diminuição significativa na imunoreatividade ocorreu, sobretudo, em cardiomiócitos que apresentavam, no exame histopatológico, aumento da eosinofilia citoplasmática ou nas células com características histológicas de morte celular (Figuras 12 e 14). A redução na

imunomarcção foi mais intensa no Ovino 31266, que recebeu MF, por via oral, doses subletais de 0,2 mg/kg/dia durante 4 dias. Nos miócitos remanescentes e intactos dos animais intoxicados e daqueles utilizados como controle negativo, observou-se marcada imunorreatividade. Os resultados comparativos entre tempo de administração, evolução e achados histopatológicos na coloração de HE e IHQ em ovinos encontram-se no quadro 4.



Figura 7: Áreas de hipereosinofilia de cardiomiócitos (detalhe) Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 4x)

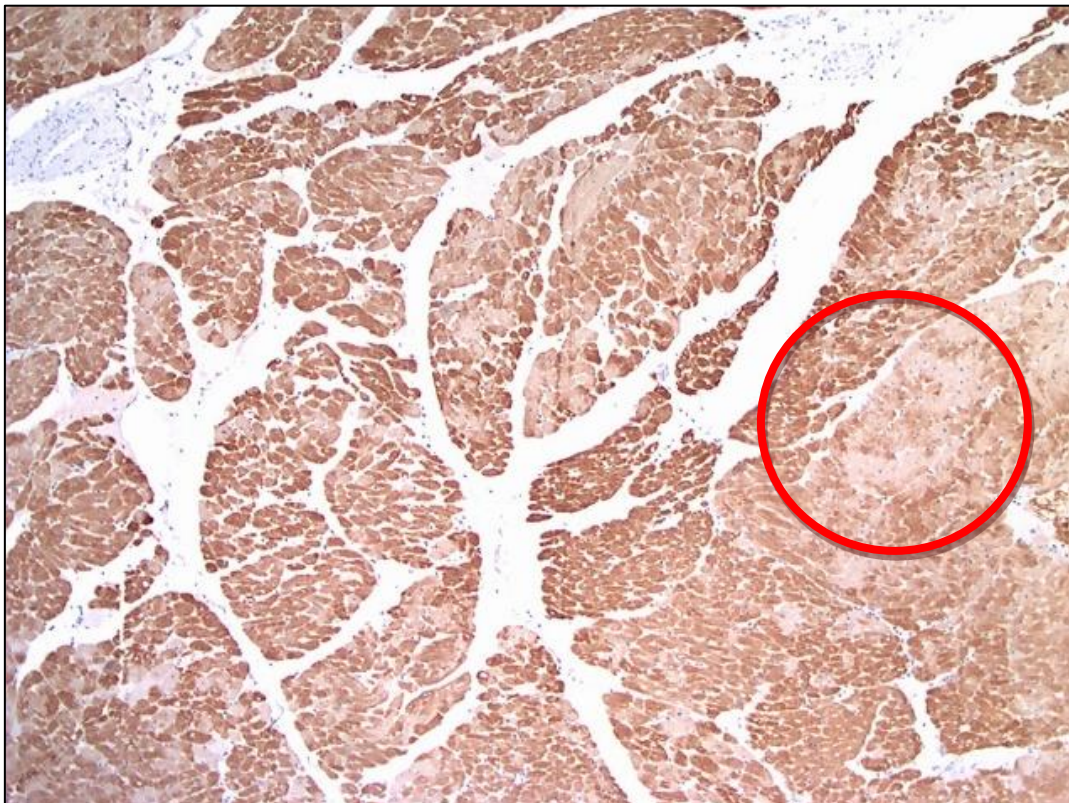


Figura 8: Diminuição da expressão para o anticorpo anti-cTnC (detalhe). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 4x)

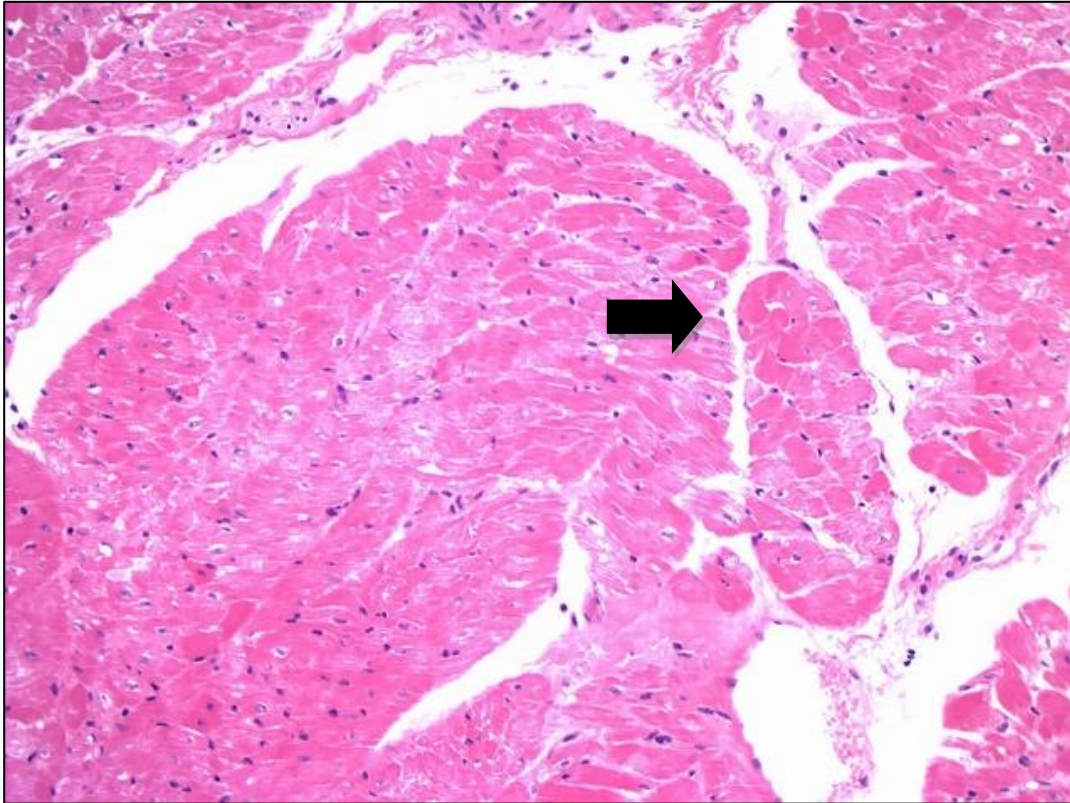


Figura 9: Focos cardiomiócitos hipereosinofílicos (seta). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 10x).

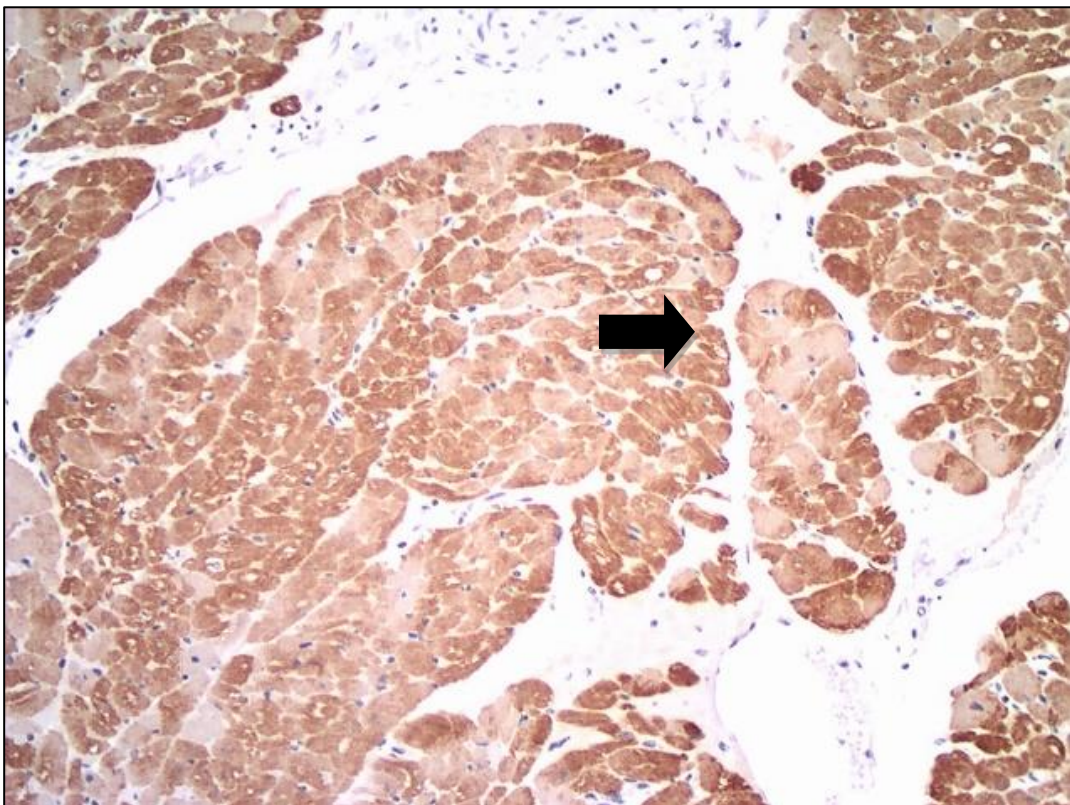


Figura 10: Diminuição da expressão para o anticorpo anti-cTnC (seta). Bovino 31210 (1,0 mg/kg) (Objetiva 10x).

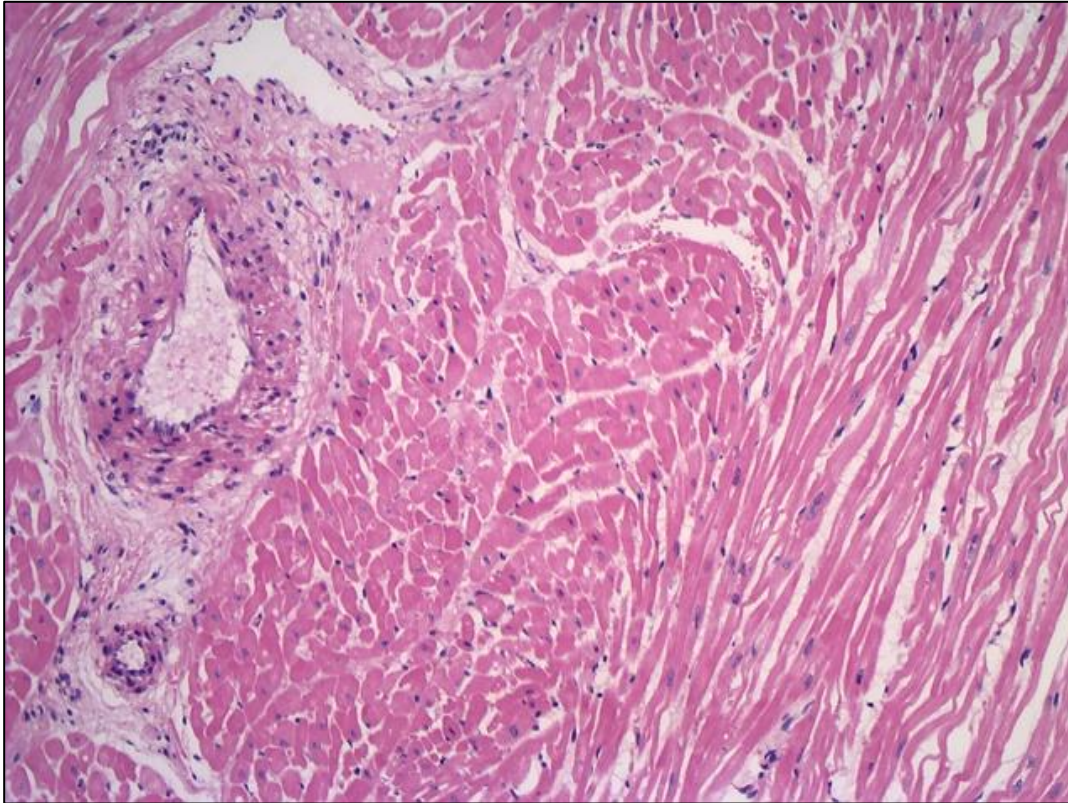


Figura 11: Áreas de hipereosinofilia. Ovino 31263 (0,1 mg/kg/dia por 4 dias) (Objetiva 10x)

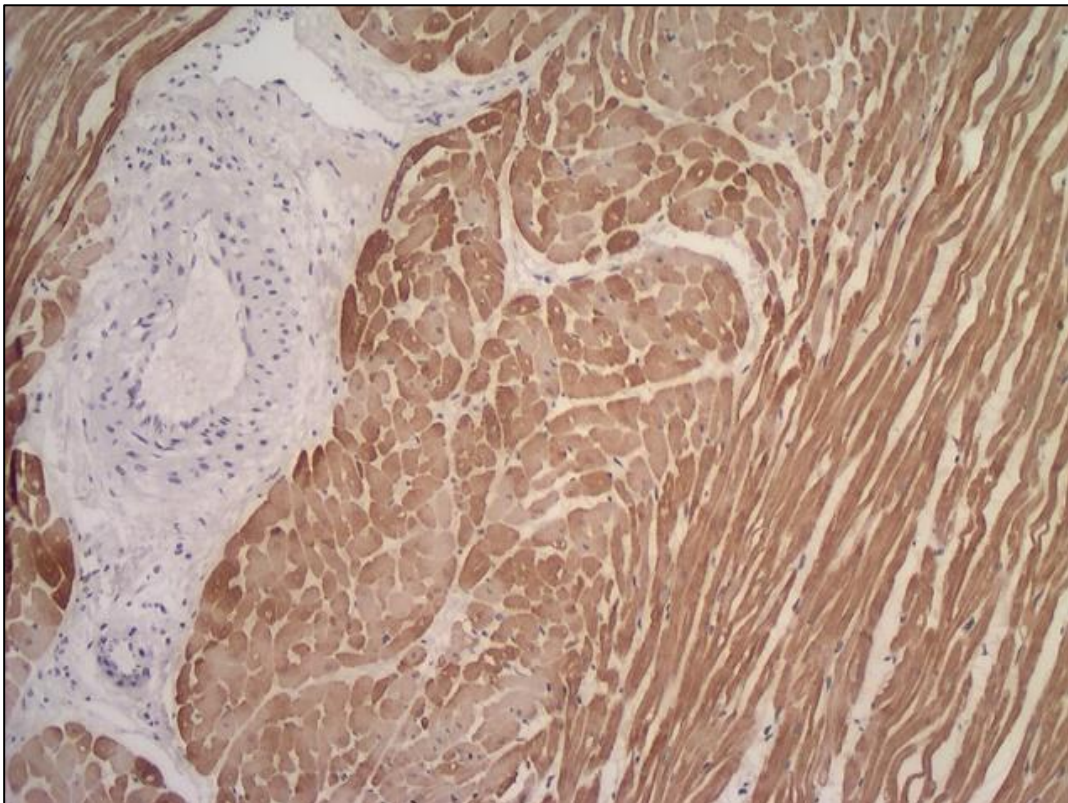


Figura 12: Diminuída expressão para o anticorpo anti-cTnC. Ovino 31263 (0,1 mg/kg/dia por 4 dias) (Objetiva 10x)

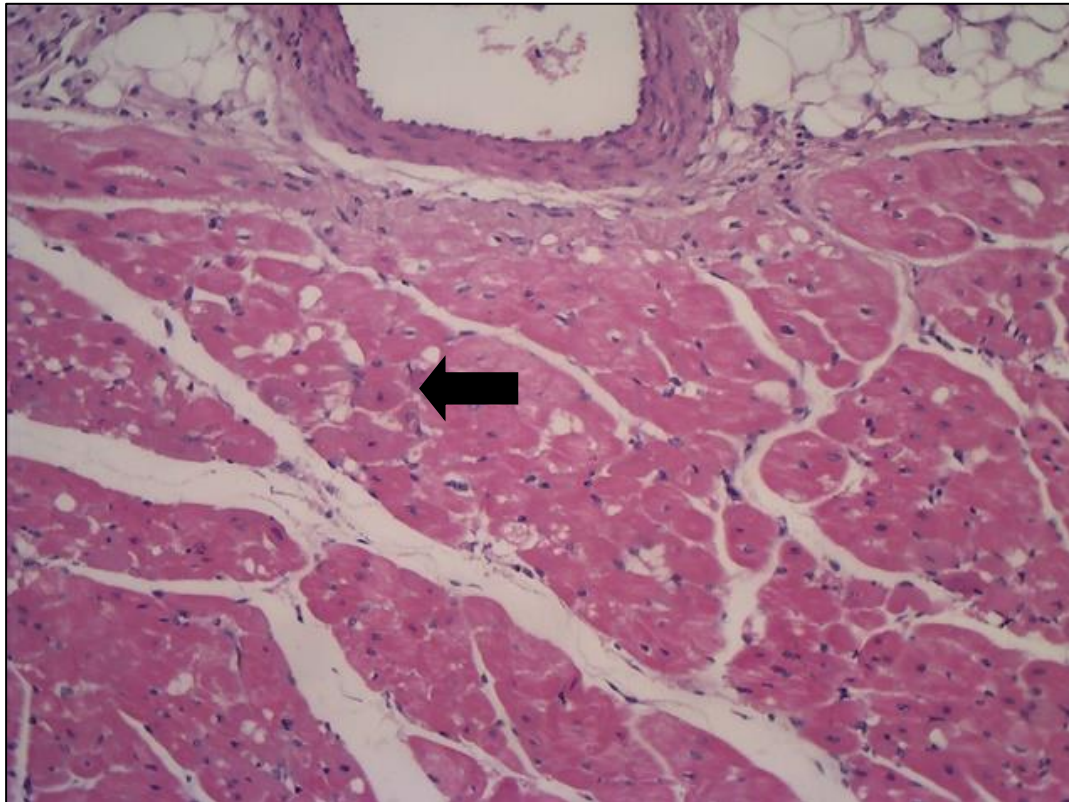


Figura 13: Áreas de hipereosinofilia com necrose e floculação de fibras musculares (seta). Ovino 31266 (0,2 mg/kg/dia por 6 dias) (Objetiva 20x)

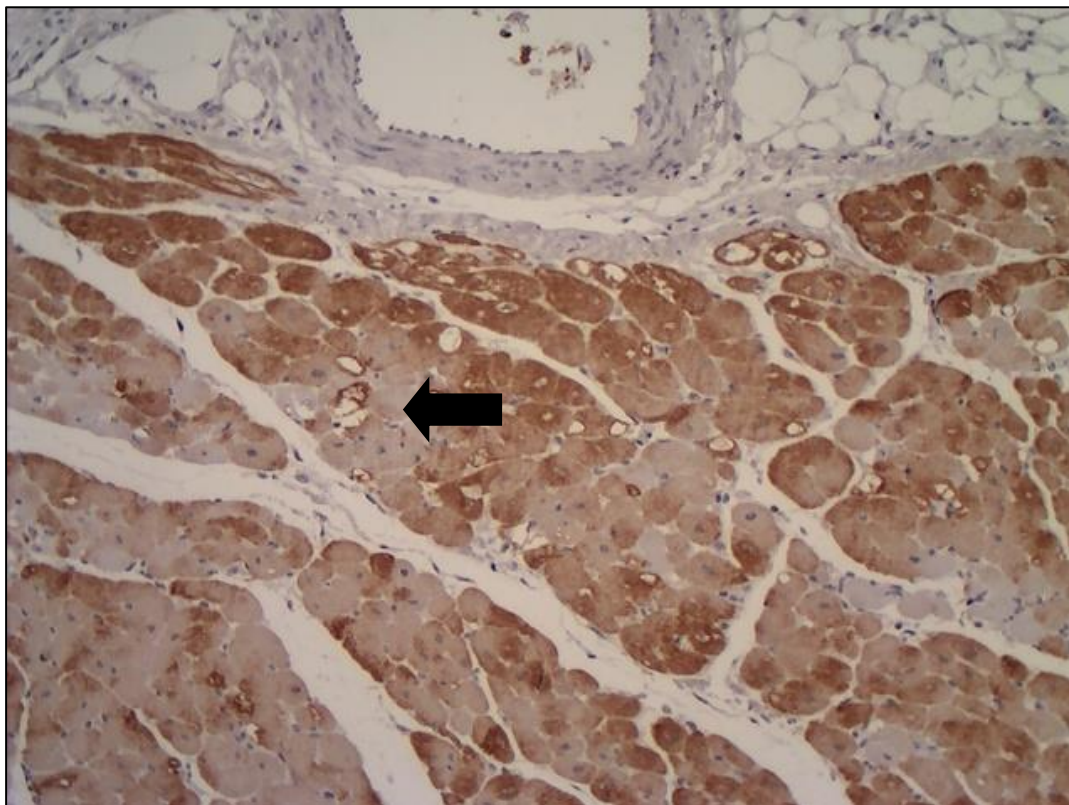


Figura 14: Acentuada perda de expressão para anticorpo anti-cTnC (seta). Ovino 31266 (0,2 mg/kg/dia por 6 dias) (Objetiva 20x)

Quadro 3. Resultados comparativos entre tempo de administração, evolução e achados histopatológicos na coloração de HE e IHQ em bovinos

SAP	Administração de MF	Tempo desde a administração à apresentação dos sintomas	Evolução clínica	HE	IHQ – Anti-cTnC (Marcação negativa)
31209	0,5 mg/kg, dose única, VO	2h e 24 minutos	12h e 20 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos +	+
31210	1,0 mg/kg, dose única, VO	3h e 20 minutos	5h e 55 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos ++ Inflamação mononuclear +	++
31211	0,5 mg/kg, dose única, VO	1h e 15 minutos	3h e 50 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos ++ (+)	++
31212	1,0 mg/kg, dose única, VO	2h	3h e 9 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos ++ Inflamação mononuclear +	++
31213	0,5 mg/kg, dose única, VO	8h e 35 minutos	11h e 24 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos +++ Cariólise + Inflamação mononuclear ++	++(+)
31214	1,0 mg/kg, dose única, VO	3h e 28 minutos	1h e 50 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos ++(+) Pícnose nuclear ++(+) Inflamação mononuclear +	+++

Legenda: SAP = Registro no Setor de Anatomia Patológica, MF = Monofluoroacetato de sódio, HE = Hematoxilina-Eosina, IHQ = Imuno-histoquímica, VO = Via Oral

(+) = Discreta, + = Leve, ++ = Moderada, ++(+)= Acentuada, +++ = Muito Acentuada

Quadro 4. Resultados comparativos entre tempo de administração, evolução e achados histopatológicos na coloração de HE e IHQ em ovinos

SAP	Administração de MFAS	Tempo desde a administração à apresentação dos sintomas)	Evolução clínica	HE	IHQ – Anti-cTnC (marcação negativa)* –
31260	0,5 mg/kg, dose única, VO	14h e 6min	7h e 55min	Hipereosinofilia de cardiomiocitos (+) Inflamação mononuclear +	++(+)
31261	1,0 mg/kg, dose única, VO	13h e 20min	10 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos ++(+) Inflamação mononuclear +	++(+)
31263	Doses subletais de 0,1 mg/kg/dia durante 4 dias VO	Encontrado morto sem sinais de autólise		Hipereosinofilia de cardiomiocitos ++ Inflamação mononuclear +	++(+)
31265	1,0 mg/kg, dose única, VO	9h e 44min	3 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos +(+)	++
31266	Doses subletais de 0,2 mg/kg/dia durante 4 dias VO	3 dias, 16h e 31 minutos após 1ª adm	33h e 5 minutos	Hipereosinofilia de cardiomiocitos +++ Lise de cardiomiócitos ++ Inflamação mononuclear ++	+++

Legenda: SAP = Registro no Setor de Anatomia Patológica, MF = Monofluoroacetato de sódio, HE = Hematoxilina-Eosina, IHQ = Imuno-histoquímica, VO = Via Oral

(+) = Discreta, + = Leve, ++ = Moderada, ++(+) = Acentuada, +++ = Muito Acentuada

4.2. Protocolos experimentais

Bovino controle – Intoxicado por *Palicourea aff. juruana*

Coração:

Histopatologia: Acentuada necrose coagulativa de cardiomiócitos com perda de estriações e áreas de floculação das fibras, associada a infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos e, em menor número, linfócitos. Havia ainda moderada proliferação de tecido conjuntivo ao redor da área necrótica.

Imuno-histoquímica: Acentuada perda de imunorreatividade para cTnC em grandes áreas da secção histológica, sobretudo ao redor de focos inflamatórios histiocitários.

Bovino 31209

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e moderada congestão.

Coração:

Histopatologia: Discretas áreas de hipereosinofilia. Por vezes, em um mesmo campo, observam-se fibras hipereosinofílicas em meio às fibras de morfologia normal. Havia ainda cistos de *Sarcocystis* spp., sem reação inflamatória ou necrose associadas.

Imuno-histoquímica: Pequena área com redução da expressão da cTnC.

Bovino 31210

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial.

Coração:

Histopatologia: Acentuada hipereosinofilia de grupos de miofibras ou de células isoladas. Havia cistos de *Sarcocystis* spp. (sem inflamação e necrose ao redor) e pequenas áreas com infiltrado inflamatório constituído por plasmócitos, linfócitos e histiócitos ao redor de vasos e fibras de Purkinje.

Imuno-histoquímica: Cardiomiócitos com fraca imunorreatividade em meio a outras com forte imunorreatividade para o anticorpo anti-cTnC. A presença de *Sarcocystis*

spp. e do infiltrado inflamatório não alteraram a imunorreatividade dos miócitos adjacentes, que apresentaram o mesmo padrão de marcação do restante da secção histológica.

Bovino 31211

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais.

Coração:

Histopatologia: Moderada hipereosinofilia de cardiomiócitos multifocal. Presença de *Sarcocystis* spp.

Imuno-histoquímica: Grandes focos de cardiomiócitos com acentuada perda de imunorreatividade.

Bovino 31212

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial.

Coração:

Histopatologia: Grupos de miócitos com marcada hipereosinofilia. Pequena quantidade de macrófagos próximos às fibras de Purkinje.

Imuno-histoquímica: Pequenos focos de inflamação linfohistioplasmocitária. Grandes focos de cardiomiócitos com acentuada perda de imunorreatividade.

Bovino 31213

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais, leve congestão, leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial e presença de filtrado em forma de glóbulos.

Coração: Histopatologia: Grandes focos de hipereosinofilia de cardiomiócitos, nos quais algumas fibras apresentavam menor evidência das estriações musculares. Pequenos focos de infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário.

Imuno-histoquímica: Moderada perda de imunorreatividade em parte da secção histológica e algumas áreas em que havia perda de marcação individualizada.

Bovino 31214

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e em túbulos retos com leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial.

Coração:

Histopatologia: Acentuada hipereosinofilia de cardiomiócitos, com núcleos picnóticos, ora apresentando citoplasma floculado, ora hialinizado. Pequenas áreas com infiltrado inflamatório linfohistiocitário.

Imuno-histoquímica: Marcada perda de imunorreatividade em diversas áreas da secção histológica, tanto em grandes áreas quanto em fibras individualizadas.

Ovino controle - Intoxicado por Monensina

Coração:

Histopatologia: Acentuada hipereosinofilia em diversos miócitos acompanhada de acentuado infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos e poucos linfócitos e plasmócitos. Picnose, carólise e citoplasmólise foram observados em alguns cardiomiócitos.

Imuno-histoquímica: Depleção na imunomarcagem de fibras cardíacas, na qual algumas apresentavam fraca imunorreatividade em meio a outras com expressão normal para cTnC.

Ovino 31260

Rim: Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e leve congestão.

Coração:

Histopatologia: Pequenos focos de hipereosinofilia com leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

Imuno-histoquímica: Acentuada perda da imunorreatividade multifocal por toda secção histológica.

Ovino 31261

Rim: Leve degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial.

Coração:

Histopatologia: Diversos focos de acentuada hipereosinofilia e pequenos focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário peri-vascular.

Imuno-histoquímica: Acentuada perda da imunorreatividade foi observada em miócitos individualizados e em pequenos focos.

Ovino 31263

Rim: Acentuada degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e leve em túbulos retos.

Coração:

Histopatologia: Pequenas áreas com moderada hipereosinofilia e pequenos focos de infiltrado inflamatório mononuclear.

Imuno-histoquímica: Acentuada perda de imunorreatividade, por vezes em grandes focos ou em miócitos individualizados.

Ovino 31265

Rim: Discreta degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais e leve congestão.

Coração:

Histopatologia: Pequenas áreas de leve hipereosinofilia.

Imuno-histoquímica: Moderada perda de imunorreatividade em pequenos focos.

Ovino 31266

Rim: Acentuada degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos tubúlos contorcidos distais, moderada em túbulos retos e leve congestão.

Coração:

Histopatologia: Hipereosinofilia de cardiomiócitos muito acentuada. Citoplasmólise de fibras musculares, associada a cariopcnose e cariólise eram observadas em diversos focos pela secção histológica. Pequenos focos de infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos fagocitavam fibras necróticas.

Imuno-histoquímica: Acentuada perda de imunorreatividade em diversos cardiomiócitos.

5. DISCUSSÃO

Nos cardiomiócitos dos bovinos e ovinos intoxicados por MF, verificou-se redução dos níveis de expressão da cTnC no citoplasma de grupos de fibras musculares. Diminuição significativa na imunorreatividade ocorreu, sobretudo, em cardiomiócitos que apresentavam, no exame histopatológico, aumento da eosinofilia citoplasmática ou demais características histológicas de morte celular. Em diversos grupos de células havia completa perda de imunomarcção. Nos miócitos remanescentes e intactos dos animais intoxicados e daqueles utilizados como controle negativo, observou-se marcada imunorreatividade. Aumento da eosinofilia citoplasmática de fibras cardíacas também foi verificada em bovinos intoxicados naturalmente por *Mascagnia (Amorimia)* sp. (GAVA et al., 1998). Recentemente, verificou-se, através da imuno-histoquímica para cTnC, a presença de lesões degenerativo-necróticas no coração de bovinos intoxicados por *Amorimia exotropicalis* (PAVARINI et al., 2012; BANDINELLI et al., 2014).

A diminuição ou ausência da expressão de troponina cardíaca observada neste estudo indica lesão na miofibrila. No homem, as troponinas são os marcadores bioquímicos mais sensíveis e específicos para detecção de lesão miocárdica (WELLS et al., 2008). Dosagem sérica de troponina foi realizada em bovinos com lesões cardíacas, em casos de febre aftosa (TUNCA et al., 2008; KARAPINAR, 2010), endocardite valvular (BUCZINSKI; BÉLANGER, 2010), pericardite (MELLANBY et al., 2007), intoxicação por monensina (VARGA et al., 2009) e infecção por *Theileria annulata* (FARTASHVAND et al., 2014). Em ovinos, a troponina sérica foi dosada em casos de arritmia cardíaca após intoxicação por salinomicina (HAJIMOHAMMADI et al., 2014) e lesão miocárdica em animais com acidose láctica ruminal (KIRBAS et al., 2014). Com relação à imuno-histoquímica, são escassos os trabalhos que relatam o uso do anticorpo anti-cTnC na detecção de alterações cardíacas em bovinos (TUNCA et al., 2008; PAVARINI et al., 2012) e ovinos (COSTA et al., 2014). O anticorpo cTnC humano é sensível para detectar lesões cardíacas em bovinos (PAVARINI et al., 2012) e ovinos (COSTA et al., 2014), o que sugere que os sítios antigênicos para estas proteínas são similares entre as espécies testadas.

As duas espécies apresentaram diferentes padrões na imunorreatividade com o anticorpo cTnC, uma vez que, em bovinos, observou-se diminuição da expressão do

anticorpo independente da dose do MF e do tempo de evolução. Por outro lado, em ovinos, a perda de expressão para cTnC estava relacionada com a dose da substância e a evolução clínica. Essas diferenças podem ter ocorrido pelo fato dos ovinos serem naturalmente menos sensíveis à intoxicação por MF e apresentarem, em média, evolução clínica mais prolongada em relação aos bovinos (PEIXOTO et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2011), mas também não se pode descartar o fato da expressão de cTnC não ocorrer de maneira uniforme por todo o miocárdio (BANDINELLI et al., 2014).

Frequentemente eram vistos pequenos focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário ao redor de vasos sanguíneos, sobretudo nos corações de bovinos. Estas alterações são comuns em decorrência de resposta imunológica à presença de cistos de *Sarcocystis* spp. em algumas seções histológicas (LOPES, 2004). Entretanto, adicionalmente, animais com lesões mais severas e visíveis na coloração HE, apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear em resposta à necrose coagulativa de cardiomiócitos, com floculação e fagocitose de fibras musculares. A imunomarcagem de células inflamatórias foi observada por Tunca et al. (2008) em decorrência da fagocitose de restos celulares de cardiomiócitos necróticos que podem conter traços das proteínas em seu interior. Tal fato não foi observado no nosso estudo, mesmo no Ovino 31266, intoxicado com doses subletais de 0,2 mg/kg/dia durante 4 dias, que apresentou lesões degenerativo-necróticas.

O diagnóstico das intoxicações por MF em bovinos (NOGUEIRA et al., 2010) e ovinos (PEIXOTO et al., 2010) e por plantas que possuem esta substância como princípio tóxico (CHENOWETH; GILMAN, 1946; PEIXOTO et al., 2010; COOK et al., 2014), se baseia, inicialmente, na epidemiologia, associada à presença da planta no local e ao histórico de morte súbita. A típica DHV, quando presente, é de grande valor diagnóstico (PEIXOTO et al., 2010). Os achados de necropsia como ingurgitamento de vasos, edema e congestão pulmonares, hidropericárdio e edemas subserosos (NOGUEIRA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2010) corroboram a hipótese de que em ambos os casos pode haver lesão miocárdica. Apesar disso, os achados histológicos, obtidos na coloração rotineira (HE) sobre o coração, não são considerados suficientes como forma diagnóstica para as intoxicações. No presente trabalho, a diminuição ou ausência da expressão da cTnC nos animais intoxicados por MF permitiu estabelecer a diferença entre necrose coagulativa de cardiomiócitos e artefatos. Isso indica que este

método pode ser utilizado com segurança para identificação de quaisquer lesões regressivas precoces, ou não, no miocárdio, independentemente da causa. Adicionalmente, é possível afirmar que, dependendo do tempo de evolução, a toxicose por MF, bem como por plantas causadoras de morte súbita em bovinos e ovinos, podem cursar com lesões necrotizantes no miocárdio, como já descrito em casos de intoxicação por *Fridericia (Pseudocalymma) elegans* (HELAYEL et al., 2009), *Palicourea aff. juruana (Palicourea juruana)* (TOKARNIA; DÖBEREINER, 1982) e *Amorimia exotropica* (PAVARINI et al., 2012) em bovinos e *Amorimia sepium* em ovinos (SCHONS et al., 2011).

Neste trabalho, detectou-se a presença de alterações regressivas precoces no miocárdio de bovinos e ovinos intoxicados experimentalmente por MF, através da utilização imuno-histoquímica da cTnC, o que torna o método uma valiosa ferramenta diagnóstica. Ainda é possível correlacionar as lesões à ingestão de MF contido nas plantas que causam morte súbita, ou seja, é uma forma indireta de demonstrar que o MF é o princípio tóxico responsável pela parada cardíaca de animais que ingerem as plantas desse grupo.

6. CONCLUSÕES

- Comprovou-se, através de imuno-histoquímica, que há diminuição da expressão de cTnC nos cardiomiócitos de bovinos e ovinos intoxicados por MF;
- É possível utilizar o método de imuno-histoquímica com cTnC para auxiliar no diagnóstico da intoxicação por MF ou plantas que o contém;
- O anticorpo anti-cTnC humano se mostrou eficaz para detectar lesões cardíacas em bovinos e ovinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. The complement system. In: **Celular and Molecular Immunology**. Philadelphia, 2^o edição, p. 295-316, 1994.
- ADAMS, J.E.; ABENDSCHEIN, D.R.; JAFFE, A.S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? **Circulation**, v. 88, p. 750-763, 1993.
- AIRES, M. M. Regulação da excreção renal de eletrólitos e do volume do fluido extracelular. **Fisiologia**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, cap. 58, 934p, 1999.
- ANNISON, E. F.; HILL, K. J.; LINDSAY D .B.; PETERS R. A. Fluoroacetate poisoning in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 70, p. 145-155, 1960.
- APEVISA. **Agência Pernambucana de Vigilância Sanitária**. Apevisa apreende 302 frascos com raticida ilegal, 2009. Disponível em <<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/apevisa-apreende-302-frascos-com-raticida-ilegal/>> Acesso em 05 fev. 2015.
- APVMA. Sodium Fluoroacetate Final Review Report and Regulatory Decision – The Reconsideration of Registrations of Products Containing Sodium Fluoroacetate and Approvals of their Associated Labels. **Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority**, Canberra, 2008.
- ASLANI, M. R.; MOHRI, M.; MOVASSAGHI, A. R. Serum troponin I as an indicator of myocarditis in lambs affected with foot and mouth disease. **Veterinary Research Forum**, v. 4, n. 1, p. 59-62, 2013.
- AULERICH R. J.; RINGER R. K.; SAFRONOFF J. Primary and secondary toxicity of warfarin, sodium monofluoroacetate, and methyl parathion in mink. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 16, p. 357-366, 1987.
- ATAOLLAHI, F.; MOHRI, M.; SEIFI H. A. Diagnostic value of cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase (CK), and aspartate amino transferase in selenium deficiency in lambs. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 164, n. 4, p. 207-211, 2013.
- BANDARRA, P.M.; COLODEL, E.M.; RAYMUNDO, D.L.; PEDROSO P.M. O.; BORBA M. R.; DRIEMEIER D. Intoxicações em ruminantes por *Mascagnia* sp. no Rio Grande do Sul diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária. **XVII Salão de Iniciação Científica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, 2005.
- BANDINELLI, M.B.; BASSUINO, D. M.; FREDO, G.; MARI, C.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropica*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 837-844, 2014.

- BARON, M. L.; BOTHROYD, C.M.; ROGERS, G. L.; STAFFA, A; RAE I. D. Detection and measurement of fluoroacetate in plant extracts by ¹⁹F-NMR. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2293-2295, 1987.
- BARTLETT, G. R.; BARRON, E. S. G. The effect of fluoroacetate on enzymes and on tissue metabolism. Its use for the study of the oxidative pathway of pyruvate metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 170, n. 1, p. 67-82, 1947.
- BAŞBUĞAN, Y.; AĞAOĞLU, Z.; YÜKSEK, N. An investigation on serum troponin concentration in healthy ruminants. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 16, n. 4, p. 641-645. 2010.
- BEASLEY, M. Guidelines for the Safe Use of Sodium Fluoroacetate (1080). **Occupational Safety and Health Service**, New Zealand. 20p, 2002.
- BRASIL. **Normas Gerais para Registro de Desinfetantes Domissanitários**. Portaria nº 321, de 28 de julho de 1997, 1997. Disponível em <<http://www.pragas.com.br/legislacao/bancodedados/port321-97.php>> Acesso em 27 nov. 2014.
- BUCZINSKI, S.; BÉLANGER, A. Bovine tricuspid endocarditis as a cause of increased serum concentration of cardiac troponins. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 195, 2010.
- BUFFA, P.; PASQUALI-RONCHETTI, I. Biochemical lesions of respiratory enzymes and configurational changes of mitochondria in vivo. **Cell and Tissue Research**, v. 183, p. 1-23, 1977.
- BUFFA, P.; PETERS, R. A. Formation of citrate *in vivo* induced by fluoroacetate poisoning. **Nature**, v. 163, p. 914, 1949.
- BURGER, I. H.; FLECKNELL, P. A. Poisoning, p.656-677. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**, 2nd ed. Blackwell, New York, 1994.
- BURNS, R. J.; CONNOLLY, G. E. Toxicity of compound 1080 livestock protection collars to sheep. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, p. 141-144, 1995.
- CARMO, P.; IRIGOYEN, L. F.; LUCENA, R. B.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. Spontaneous coffee senna poisoning in cattle: Report on 16 outbreaks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 139-146, 2011.
- CAMPOBASSO, C. P.; DELL'ERBA, A. S.; ADDANTE, A.; ZOTTI, F.; ARZULLO, A.; COLONNA, M. F. Sudden cardiac death and myocardial ischemia indicators a comparative study of four immunohistochemical markers. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 29, n. 2, p. 154-161, 2008.

- CHANTRANUWAT, C.; QIAO, J. H.; KOBASHIGAWA, J.; HONG, L.; SHINTAKU, P.; FISHBEIN, M. C. Immunoperoxidase staining for C4d on paraffin-embedded tissue in cardiac allograft endomyocardial biopsies. **Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology**, v. 12, n. 2, p. 166-171, 2004.
- CHENOWETH, M. B.; GILMAN, A. Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species responses to fluoroacetate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 87, p. 90-103, 1946.
- CHI, C. H.; CHEN, K. W.; CHAN, S. H.; WU, M. H.; HUANG, J. J. Clinical presentation and prognostic factors in sodium monofluoroacetate intoxication. **Clinical Toxicology**, v. 34, p. 707-712, 1996.
- CHI, C.-H.; LIN, T. K.; CHEN, K. W. Hemodynamic abnormalities in sodium monofluoroacetate intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, v. 18, p. 351-353, 1999.
- CLARKE, D. D. Fluoroacetate and fluorocitrate: Mechanism of action. **Neurochemical Research**, v. 16, n. 9, p. 1055-1058, 1991.
- COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C.; SAKATE, M.; CROCCI, A. J. Variabilidade clínica na determinação da dose tóxica oral em intoxicação experimental por fluoroacetato de sódio em gatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 117-124, 2006.
- COOK, D.; LEE, S.T.; TAYLOR, C.M.; BASSÜNER, B.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.A.; GARDNER, D.R. Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species. **Toxicon**, v. 80, p. 9-16, 2014.
- COSTA, S. Z. R.; PEIXOTO P. V.; D'AVILA, M. S.; SANTOS, A.M.; NOGUEIRA, V. A.; DRIEMEIER, D.; BRUST, L.A.C.; FRANÇA, T.N. Troponina C na detecção de alterações regressivas precoces no miocárdio de ovinos intoxicados naturalmente por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae). **Anais do VIII Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário**. VIII ENDIVET, Cuiabá, MT, 2014.
- CUNHA L.C. Avaliação dos efeitos tóxicos de *Mascagnia rigida* em ratos: estudo anatomopatológico, comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio. **Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo, SP**. 100p, 2008.
- DORAN, J.P.; HOWIE, A.J.; TOWNEND, J.N.; BONSER, R.S. Detection of myocardial infarction by immunohistological staining for C9 on formalin fixed, paraffin wax embedded sections. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, p. 34-37, 1996.
- DURANDO, M.M.; REEF, V.B.; KLINE, K.; BIRKS, E.K. Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 3, n. 4, p. 217-223, 2006.

- EASON, C. T.; GOONERATNE, R.; FITZGERALD H.; WRIGHT G.; FRAMPTON C. Persistence of sodium monofluoroacetate in livestock animals and risk to humans. **Human & Experimental Toxicology**, v. 13, p. 119-122, 1994.
- EASON, C.; MILLER, A.; OGILVIE, S.; FAIRWEATHER, A. An updated review of the toxicology and ecotoxicology of sodium fluoroacetate (1080) in relation to its use as a pest control tool in New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1-20, 2011.
- EASTLAND, W.G.; BEASOM S. L. Effects of ambient temperature on the 1080-LD50 of racoons. **Wildlife Society Bulletin**, v. 14, p. 234-235, 1986.
- EGEKEZE, J.O.; OEHME, F. W. Inorganic and organic fluoride concentrations in tissues after the oral administration of sodium monofluoroacetate (compound 1080) to rats. **Toxicology**, v. 15, p. 43-53, 1979.
- EISLER, R. Sodium monofluoroacetate (1080) hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. **Biological Report 27, U.S.** National Biological Service, Patuxent Environmental Science Centre. 52p, 1995.
- ENTMAN, M.L.; YOUKER, K.; SHOJI, T.; KUKIELKA, G.; HAPPELL, S.B.; TAYLOR, A. A.; SMITH, C. W. Neutrophil Induced Oxidative Injury of Cardiac Myocytes a Compartmented System Requiring CD11b/CD18-ICAM-1 Adherence. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 1335-1345, 1992.
- EPA. Sodium fluoroacetate. **Office of Pesticides and Toxic Substances**, U.S. 1995.
- FARTASHVAND, M.; NADALIAN, M.G.; SAKHA, M.; SAFI, S. Elevated serum cardiac troponin I in cattle with theileriosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 194-199, 2014.
- FISHBEIN, M.C.; WANG, T.; MATIJASEVIC, M.; HONG, L.; APLE, F. S. Myocardial tissue troponins T and I. **Cardiovascular Pathology**, v. 12, n. 2, p. 65-71, 2003.
- FOSS, G.L. The toxicology and pharmacology of methyl fluoroacetate (MFA) in animals, with some notes on experimental therapy. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 3, p. 118-127, 1948.
- GAL, E.M.; PETERS, R.A.; WAKELIN, R.W. Some effects of synthetic fluoro compounds on the metabolism of acetate and citrate. **Biochemical Journal**, v. 64, n. 1, p. 161, 1956.
- GAGNIN, M. A. H.; MARAVALHAS, N. Ocorrência de alcalóides no gênero *Palicourea*. **Anais do 20º Congresso Nacional de Botânica**, Goiânia, Goiás, p. 91-105, 1969.
- GAVA, A.; CRISTANI, J.; BRANCO, J. V.; NEVES, D. S.; MONDADORI, A. J.; SOUZA, R. S. Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia*

- sp.(Malpighiaceae), no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 16-20, 1998.
- GLATZ, J.F.C.; VAN DER VUSSE, G. J. Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. In: **Cellular Fatty Acid-binding Proteins**. Springer US, p. 237-251, 1990.
- GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.**, v. 71, n. 4, p. 629-633, 1998.
- GOH, C. S. S.; HODGSON, D. R; FEARNside, S. M.; HELLER, J.; MALIKIDES N. Sodium monofluoroacetate (Compound 1080) poisoning in dogs. **Australian Veterinary Journal**. v.83, n.8, p.474-479, 2005.
- GRIBBLE, G. W. Fluoroacetate toxicity. **Journal of Chemical Education**, v.50, p.460-463, 1973.
- HAIKALA, H.; KAIVOLA, J.; NISSINEN, E.; PÄIVI, W.; LEVIJOKI, J.; LINDÉN, I. Cardiac Troponin C as a Target Protein for a novel Calcium Sensitizing Drug, Levosimendan. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, p. 1859-1866. 1995.
- HAJIMOHAMMADI, A.; RAJAIAN, H.; KHALIJI, E.; NAZIFI, S.; ANSARI-LARI, M. Serum cardiac troponin I as a biomarker in cardiac degeneration following experimental salinomycin toxicosis in sheep. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 1, p. 41-51, 2014.
- HELAYEL, M. A.; FRANÇA, T. N.; SEIXAS, J. N.; NOGUEIRA, V. A.; CALDAS, S. A.; PEIXOTO, P. V. Morte súbita em bovinos causada pela ingestão de *Pseudocalymma elegans* (Bignoniaceae) no município de Rio Bonito, RJ. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 498-508, 2009.
- HORNSHAW, T. C.; RINGER, R. K.; AULERICH, R. J.; CASPER, H. H. Toxicity of sodium monofluoroacetate (Compound 1080) to mink and European ferrets. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 5, p. 213–223, 1986.
- HU, B. J.; CHEN, Y. C.; ZHU, J. Z. Immunohistochemical study of fibronectin for postmortem diagnosis of early myocardial infarction. **Forensic Science International**, v. 78, p. 209-217, 1996.
- HUMPHREYS, D. J. **Veterinary Toxicology**. 3rd ed. Bailliere Tindall, London. 356p, 1988.
- HUXLEY, H. E. The contractile structure of cardiac and skeletal muscle. **Circulation**, v. 24, p. 328-335, 1961.
- INGWALL, J. S.; KRAMER, M. F.; FIFER, M. A.; LORELL, B. H.; SHEMIN, R.; GROSSMAN, W.; ALLEN, P. D. The creatine kinase system in normal and

- diseased human myocardium. **New England Journal of Medicine**, v. 313, n. 17, p. 1050-1054, 1985.
- JENKINS, C. P.; CARDONA, D. M.; BOWERS, J. N.; OLIAI, B. R.; ALLAN, R. W.; NORMANN, S. J. The utility of C4d, C9, and troponin T immunohistochemistry in acute myocardial infarction. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, p. 256-263, 2010.
- JENSEN, R.; TOBISKA, J. W.; WARD J. C. Sodium fluoroacetate (Compound 1080) poisoning in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 9, p. 370-372, 1948.
- KATUS, H. A.; REMPPIS, A.; SCHEFFOLD, T.; DIEDERICH, K. W.; KUEBLER, W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 67, p. 1360-1367, 1991.
- KARAPINAR, T.; DABAK, D. O.; KULOGLU, T.; BULUT, H. High cardiac troponin I plasma concentration in a calf with myocarditis. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 4, p. 397, 2010.
- KENT, S. P. Diffusion of myoglobin in the diagnosis of early myocardial ischemia. **Laboratory Investigation**, v. 46, p. 265-270, 1982.
- KIRBAS, A.; BAYDAR, E.; KANDEMIR, F. M.; DORMAN, E.; KIZIL, O.; YILDIRIM, B. A. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in sheep with acute ruminal lactic acidosis. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 4, p. 355-364, 2014.
- KLEINE, A. H.; GLATZ, J. F.; VAN NIEUWENHOVEN, F.A.; VAN DER VUSSE, G. J. Release of heart fatty acid-binding protein into plasma after acute myocardial infarction in man. In: **Lipid Metabolism in the Healthy and Disease Heart**, Springer US. p. 155-162. 1992.
- KLEINE, A.H.; GLATZ, J. F. C.; HAVENITH, M. G.; NIEUWENHOVEN, F. A. V.; VAN DER VUSSE G. J.; BOSSMAN, F. T. Immunohistochemical detection of very recent myocardial infarctions in humans with antibodies against heart-type fatty acid-binding protein. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 1, p. 63-69. 1993.
- KREBS, H.C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. **Toxicon**, v. 32, p. 909-913, 1994.
- LAGRAND, W. K.; NIESSEN, H. W.; WOLBINK, G. J.; JASPARS, L. H.; VISSER, C. A.; VERHEUGT, F. W. A.; MEIJER, C. J. L. M.; HACK, C. E. C-Reactive Protein Colocalizes With Complement in Human Hearts During Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 95, p. 97-103, 1997.

- LEE, S. T.; COOK, D.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J. A.; ANDERSON, W. R.; LIMA, F. G.; GARDNER, D. R. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 791-796, 2012.
- LOPES, C. W. G. O gênero *Sarcocystis* (Lankester, 1882) (Apicomplexa: Sarcocystidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, 2004.
- MARAIS, S. T. Monofluoroacetic acid, the toxic principle of "Gifblaar" *Dichapetalum cymosum* (Hook). **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 20, p. 67-73, 1944.
- MARTINS, C. S. Troponina: Estrutura, Fisiopatologia e Importância Clínica para Além da Isquemia Miocárdica. **Arquivos de Medicina**, Porto, v. 23, n. 6, 2009.
- McGIRR, J. L.; PAPWORTH, D. S. The toxicity of rodenticides. I. Sodium fluoroacetate, Antu and Warfarin. **Veterinary Record**, v. 67, p. 124-131. 1955.
- McILROY, J. C. The sensitivity of Australian animals to 1080 poison. II. Marsupial and eutherian carnivores. **Wildlife Research**, v. 8, n. 2, p. 385-399, 1981.
- McILROY, J. C. The sensitivity of Australian animals to 1080 poison IX. Comparisons between the major groups of animals, and the potential danger non-target species face from 1080-poisoning campaigns. **Australian Wildlife Research**, v. 13, p. 39-48, 1986.
- MCILROY, J. C.; GIFFORD, E. J. Secondary Poisoning Hazards Associated With 1080-Treated Carrot-Baiting Campaigns Against Rabbits, *Oryctolagus Cuniculus*. **Wildlife research**, v. 19, n. 6, p. 629-641, 1992.
- MELLANBY, R.J.; HENRY, J. P.; CASH, R.; RICKETTS S. W.; DIAS BEXIGA J. R.; MELLOR D. J. Serum cardiac troponin I concentration in cattle with pericarditis. **Veterinary Record**, v. 161, p. 455-456, 2007.
- MORAES-MOREAU, R.L.; HARAGUCHI, M.; MORITA, H.; PALERMO-NETO, J. Chemical and biological demonstration of the presence of monofluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 685-692, 1995.
- MORRISON, J. F.; PETERS, R. A. Biochemistry of fluoroacetate poisoning: the effect of fluorocitrate on purified aconitase. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 3, p. 473, 1954.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Exames diagnósticos do sistema cardiovascular. **Medicina interna de pequenos animais**. Tradução da 3^o edição. Cap. 2, 1324p, 2006.
- NOGUEIRA, V. A. **Intoxicação por Monofluoroacetato de Sódio em Bovinos: aspectos clínicos e patológicos**. 2009. 70 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

- NOGUEIRA, V.A.; FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, T.C.; CALDAS, S.A.; ARMIÉN, A. G.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.7, p. 533-540, 2010.
- NOGUEIRA, V. A.; PEIXOTO, T. C.; FRANÇA, T. N.; CALDAS, S. A.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 823-838, 2011.
- NORRIS, W. R.; EASON, C. T.; WICKSTROM M. L. Sorption of fluoroacetate (compound 1080) by colestipol, activated charcoal and anion-exchange resins in vitro and gastrointestinal decontamination in rats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, p. 269-275, 2000.
- OELRICHS, P. B.; McEWAN, T. The toxic principle of *Acacia georginae*. Queens I. **Journal of Agricultural Science**, v. 19, p. 1-16, 1962.
- OFFERMAN, S. R. R.; LEERS, M. P. G.; SUYLEN, R. J. V.; NAP, M.; DAEMEN, M. J. A. P.; THEUNISSEN, P. H. M. H. Evaluation of the membrane attack complex of complement for the detection of a recent myocardial infarction in man. **Journal of Pathology**, v. 191, p. 48-53, 2000.
- O'HAGAN, B. J. Fluoroacetate poisoning in seven domestic dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, p. 756-758, 2004.
- OLIVEIRA, M. M. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Experientia**, v. 19, p.586, 1963.
- OLIVEIRA, Z. Sensibilidade dos roedores aos novos rodenticidas. **Revista de Higiene e Saúde Pública**, v. 14, n. 1/20, p. 45-56, 1955.
- OLIVER, A. J.; KING, D. R.; MEAD, R. J. Fluoroacetate tolerance, a genetic marker in some Australian mammals. **Australian Journal of Zoology**. v. 27, p. 362-72, 1979.
- ORTMANN, C.; PFEIFFER, H.; BRINKMANN, B. A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. **International Journal of Legal Medicine**, v. 113, p. 215-220, 2000.
- OSWEILER, G. D. Rodenticides, p.289-293. In: Ibid. (Ed.), **Toxicology**. Willians and Wilkins, Philadelphia, 1996.
- OYAMA, M. A.; SISSON, D. D. Cardiac Troponin-I Concentration in Dogs with Cardiac Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 831-839, 2004.
- PARMACEK, M. S.; LEIDEN J. M. Structure and expression of the murine slow/cardiac troponin C gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 13217-13225, 1989.

- PARMACEK, M. S.; SOLARO R. J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, n. 3, p. 159-176, 2004.
- PARTON, K. Sodium monofluoroacetate (1080), p. 1055-1062. In: Ibid. (Ed.), **Small Animal Toxicology**. W.B. Saunders, Philadelphia. 2006.
- PAVARINI, S. P.; BANDINELLI, M. B.; JUFFO, G. D.; SOUZA, S. O.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F. Decreased expression of cardiac troponin C is associated with cardiac lesions in *Amorimia exotropa* poisoned cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1005-1008, 2012.
- PEIXOTO, T. C. **Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos**. 2010. 127p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- PEIXOTO, T.C; NOGUEIRA, V.A.; COELHO, C.D.; VEIGA, C. C. P.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1021-1030, 2010.
- PEIXOTO, P. V.; NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO T. C.; DÖBEREINER, J.; TOKARNIA C. H. Relationship between a peculiar form of hydropic-vacuolar degeneration of the distal convoluted tubules, monofluoroacetate poisoning, and plants that cause “sudden death” in Brazil. In: RIET-CORREA F.; PFISTER J.; SCHILD A. L.; WIERENGA T. (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins, and related Toxins**. CABI, London, p. 365-372, 2011a.
- PEIXOTO, T. C.; OLIVEIRA, L. I.; CALDAS, S. A.; CATUNDA, F. E.; JUNIOR, M. G.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 938-952, 2011b.
- PEIXOTO, T.C.; NOGUEIRA, V. A.; CALDAS, S. A.; FRANCA, T. N.; ANJOS, B. L.; ARAGAO, A. P.; PEIXOTO, P. V. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica ácido monofluoroacético como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 4, p. 219-328, 2012.
- RIBOLDI, E.; DALLEGRAVE, E.; TSAO M.; SEBEN, V.C.; CHRIST, T.C.; FRAGA, M.P.; OLIVEIRA, R.M.; CAVALCANTE L.F.H. Cat intoxication by sodium fluoroacetate: a study case. **1st Latin American Congresso of Clinical and Laboratorial Toxicology**. 2014. (Abstract). Disponível em: http://www.toxilatin.com/cdonline/index.php?secao=trabalhos&sub=avancada&start=1&trabalho_id=454. Acesso em 02 fev. 2015.
- ROBISON, W. H. Acute toxicity of sodium monofluoroacetate to cattle. **Journal of Wildlife Management**. v. 34, p. 647-648, 1970.

- SAKAI, T. F.; MIYAHARA, T. Fluorometric determination of monofluoroacetic acid. **Eisei Kagaku**, v. 27, p. 45-49, 1981.
- SCHNAUTZ, J. O. Sodium fluoroacetate (Compound 1080) poisoning in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 114, n. 864, p. 435, 1949.
- SCHONS, S. V.; DE MELLO, T. L.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Poisoning by *Amorimia (Mascagnia) sepium* in sheep in northern Brazil. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 781-786, 2011.
- SCHREIER, T.; KEDES, L.; GAHLMANN, R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 34, p. 21247-21253, 1990.
- SCHULTZ, R. A.; COETZER, J. A. W.; KELLERMAN, T. S.; NAUDÉ, T. W. Observations on the clinical, cardiac and histopathological effects of fluoracetate in sheep. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 49, p. 237-245, 1982.
- SCHWARZWALD, C.C.; HARDY, J.; BUCCELLATO, M. High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multiform ventricular tachycardia and myocardial necrosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 364-368, 2003.
- SILVA, A. R.; MARTIN, C. C. S.; ROSSI, M. A. Is immunohistochemistry a useful in the postmortem recognition of myocardial hypoxia in human tissue with no morphological evidence of necrosis? **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 23, n. 1, 2002.
- STEFANELLI, C. B.; ROSENTHAL, A.; BORISOV, A. B.; ENSING, G. J.; RUSSELL, M. W. Novel troponin T mutation in familial dilated cardiomyopathy with gender-dependant severity. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, n. 1, p. 188-196, 2004.
- STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L.; LANGOHR, I. M.; BARROS, S. S. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg.Papilionoideae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 98- 108, 2001.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação de bovinos pela “erva de rato” (*Palicourea marcgravii* St Hil) no vale do Itapicurú, Maranhão. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v. 2, p. 83-91, 1959.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 17-26, 1982.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 73-92, 1986.

- TOKARNIA C. H.; PEIXOTO P. V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.
- TOKARNIA, C. H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p, 2012.
- TRASK, R. V.; BILLADELLO, J. J. Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1049, n. 2, p. 182-188, 1990.
- TUNCA, R.; SOZMEN, M.; ERDOGAN, H.; CITIL, M.; UZLU, E.; OZEN, H.; GOKÇE, E. Determination of cardiac troponin I in the blood and heart of calves with foot-and-mouth disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 5, p. 598-605, 2008.
- VARGA, A.; SCHOBER, K. E.; HOLLOMAN, C. H.; STROMBERG, P. C.; LAKRITZ, J.; RINGS, D. M. Correlation of Serum Cardiac Troponin I and Myocardial damage in Cattle with Monensin Toxicosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1108–1116, 2009.
- VASCONCELOS, J. S.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; MEDEIROS R. M. T.; GALIZA, G. J. N.; OLIVEIRA, D. M.; PESSOA, A. F. A. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 10, p. 521-526, 2008.
- VELTMAN, C. J.; PINDER, D. N. Brushtail possum mortality and ambient temperatures following aerial poisoning using 1080. **The Journal of Wildlife Management**, v. 65, n. 3, p. 476-481, 2001.
- VICKERY, B.; VICKERY, M. L. Toxicity for livestock of organofluorine compounds present in *Dichapetalum* plant species. **Veterinary Bulletin**, v. 43, n. 10, p. 537-542, 1973.
- WELLS, S. M.; SLEEPER, M. Cardiac troponins. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 3, p. 235-245, 2008.
- WICKSTROM, M. L.; COOK, C. J.; EASON, C. T. Development of antidotes and improved treatment of 1080 toxicosis. **Landcare Research New Zealand**. 18p, 1998.
- YASOJIMA, K.; SCHWAB, C.; McGEER, P. L. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 83, n. 8, p. 860-869, 1998.
- YONEZAWA, L. A.; MACHADO, L. P.; SILVEIRA, V. F.; WATANABE, M. J.; SAITO, M. E.; KITAMURA, S. S.; KOHAYAGAWA, A. Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao

exercício e à suplementação com vitamina E. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1321-1326, 2010.

ZURITA, J. L.; JOS, A.; CAMEÁN A. M.; SALGUERO, M.; LÓPEZ-ARTÍGUEZ, M.; REPETTO, G. Ecotoxicological evaluation of sodium fluoroacetate on aquatic organisms and investigation of the effects on two fish cell lines. **Chemosphere**, v. 67, p. 1-12, 2007.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Animais utilizados:

Bovino 1190 (SAP: 31213)

Fêmea, mestiça, adulta e 432 kg. Intoxicada com dose única de 0,5 mg/kg em 50mL de água destilada. Sintomatologia iniciou-se 8h e 35 minutos após administração. Curso clínico de 11h e 24 minutos até a morte.

Bovino 1215 (SAP: 31209)

Fêmea, mestiça, adulta e 468 kg. Intoxicada com dose única de 0,5 mg/kg em 50mL de água destilada. Sintomatologia iniciou-se com 2h e 24 minutos após administração associado à movimentação forçada do animal. Curso clínico de 12h e 20 minutos até a morte.

Bovino 1262 (SAP: 31211)

Fêmea, mestiça, adulta, pesando 439 kg. Intoxicada com dose inicial de 0,05 mg/kg e 24h depois com 0,5 mg/kg. A primeira administração foi feita com a pesagem equivocada de MF e não apresentou efeitos clínicos sobre o animal. Sintomatologia iniciou-se 1h e 15 minutos após a administração da segunda dose de MF. Curso clínico de 3h e 50 minutos até a morte.

Bovino 1307 (SAP: 31212)

Fêmea, mestiça, adulta, pesando 387 kg. Intoxicada com dose inicial de 0,1 mg/kg e 24h depois com 1 mg/kg. A primeira administração foi feita com pesagem equivocada de MF e não apresentou efeitos clínicos sobre o animal. Sintomatologia iniciou-se 2h após a administração da segunda dose de MF. Curso clínico de 3h e 9 minutos até a morte.

Bovino 1327 (SAP: 31214)

Fêmea, mestiça, adulta, pesando 410 kg. Intoxicada com dose única de 1,0 mg/kg diluído em 50 ml de água destilada. Sintomatologia iniciou-se 3h e 28 minutos após administração. Curso clínico de 1h e 50 minutos até a morte.

Bovino 1358 (SAP: 31210)

Fêmea, mestiça, adulta, pesando 376 kg. Intoxicada com dose única de 1,0 mg/kg diluído em 50 mL de água destilada. Sintomatologia iniciou-se 3h e 20 minutos após administração. Curso clínico de 5h e 55 minutos até a morte.

Ovino 5761 (SAP: 31260):

Fêmea, mestiça, 3 anos de idade e 31 kg. Intoxicada com dose única de 0,5 mg/kg. Sintomatologia iniciou-se com 14h e 6min após administração. Curso clínico de 7h e 55min até a morte.

Ovino 5762 (SAP: 31261)

Fêmea, mestiça, 6 meses de idade e 19 kg. Intoxicada com dose única de 1,0 mg/kg. Sintomatologia iniciou-se com 13h e 20min após administração. Curso clínico de 10 minutos até a morte.

Ovino 5765 (SAP: 31265)

Macho, mestiço, 3 anos de idade e 53 kg. Intoxicado com dose única de 1,0 mg/kg. Sintomatologia iniciou-se com 9h e 44min após administração. Curso clínico de 3 minutos até a morte.

Ovino 5764 (SAP: 31263)

Fêmea, mestiça, 2 anos de idade e 36 kg. Intoxicada com doses subletais de 0,1 mg/kg/dia durante 4 dias. No 5º dia o animal foi encontrado morto e sem sinais de autólise.

Ovino 5766 (SAP: 31266)

Macho, mestiço, 3 anos de idade e 44 kg. Intoxicado com doses subletais de 0,2 mg/kg/dia durante 4 dias. Sintomatologia iniciou-se com 3 dias, 16h e 31 minutos após a 1ª administração. Curso clínico de 33h e 5 minutos até a morte.