

FOTOSENSIBILIZACION HEPATOGENA EN BOVINOS ASOCIADA A LA INGESTION DE ECHIUM PLANTAGINEUM L.

F.Riet Alvariza¹, F.Riet Correa¹,
E.Perdomo¹, M.Corbo¹, O.Del Puerto²,
P. Moyna³, J. Altamirano³,
H. Meny⁴, P. McCosker¹.

RESUMEN

Se describe un caso de fotosensibilización hepatógena en bovinos asociado a la ingestión de Echium plantagineum.

Las lesiones histológicas de hígado estuvieron caracterizadas por megalocitosis, necrosis periacinar, degeneración hidrópica y presencia de glóbulos citoplasmáticos. Algunos de los megalocitos eran multinucleados, presentando de 2 a 5 núcleos.

El contenido en echiumina y echimidina de la planta fue de 0.10% del peso de materia seca.

Echium plantagineum recogido de otros predios que se usaron como control dieron solamente un contenido de 0.002% de alcaloides piperidínicos sobre materia seca.

Se describen las características botánicas y ciclo vegetativo de la planta en el Uruguay.

¹ CIVET "Miguel C. Rubino". M.A.P. Casilla de Correo 177. Montevideo (Uruguay).

² Facultad de Agronomía. Montevideo (Uruguay).

³ Facultad de Química. Montevideo (Uruguay).

⁴ Médico Veterinario. Ejercicio Liberal. Colonia Suiza (Uruguay)

I. INTRODUCCION

Echium plantagineum L. (E.P.) ha sido descrito como tóxico para cerdos y ovinos (2,16). Su toxicidad es debida a la presencia de los alcaloides pirrolizidínicos echiumina y echimidina cuyas propiedades hepatotóxicas han sido demostradas (2).

Otras plantas de los géneros Senecio, Heliotropium, Crotalaria, amsinckia, Trichodesma, son hepatotóxicas para bovinos, ovinos, equinos, animales de laboratorio y el hombre, por contener un variado número de alcaloides pirrolizidínicos (2).

El género Senecio ha sido comunicado en el Uruguay como causante de intoxicación crónica en bovinos (10).

El objetivo de este trabajo es la descripción de un caso colectivo de intoxicación por E.P. en bovinos del Uruguay.

II. MATERIALES Y METODOS

A. Estudio clínico.

Se concurrió a un establecimiento ubicado en la Colonia Piamontesa en el departamento de Colonia el 10.6.75.-

B. Estudio bioquímico.

Se extrajo sangre de animales enfermos para análisis de bilirrubina (Técnica Jendrassik y Cleghorn) y SGOT (Sero Glutamato Oxalaceto Transaminasa, Técnica de Reitmann y Frankel) y hematocrito.

C. Patología.

Se realizó la necropsia de una vaca que murió espontáneamente a los 15 días de haber enfermado. Trozos de hígado, pulmón, riñón, y cerebro fueron fijados en formol al 10%, embebidos en parafina, cortados en secciones de 5 u y coloreados mediante las técnicas de hematoxilina-eosina, Perls, P.A.S. y Van Gieson.

D. Clasificación botánica de plantas recolectadas de la pradera.

Realizada en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía de Montevideo.

E. Estudio micológico de la pradera.

De acuerdo a las técnicas de Dingley J.M. (3), Thornton R.H. y Ross D.J. (17), Riet Alvariza F. y Días L.E. (12) para la identificación y conteo de esporas del hongo *Pithomyces chartarum* (Berk & Curt) M.B.

F. Determinación de alcaloides pirrolizidínicos.

Se trabajó en la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Química, con 2 muestras de E.P. Una obtenida de la pradera tóxica del caso clínico, el 10.6.75 (Muestra A) y otra obtenida en el predio del Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino" (CIVET) el 24.8.76.

1. Muestra A.

Las hojas de E.P. fueron secadas a 42°C y molidas obteniéndose - 508 gramos de polvo de hojas secas.

EXTRACCION DE ALCALOIDES:

La muestra (508 grs.) se humedeció con NH₄OH concentrado (50 ml) y posteriormente se extrajo con metanol, hasta agotamiento total.

El extracto metanólico fue evaporado (evaporador rotatorio) temperatura del baño 40°C, obteniéndose 41 gr. de extracto metanólico seco (8.1% sobre hojas secas). El extracto seco fue tomado en agua alcalinizada (NH₄OH conc., pH10) y extraído con CHCl₃ (en extractor continuo). La solución clorofórmica fue a su vez extraída con H₂SO₄ 5% (6 veces con 70 ml cada vez) y las soluciones ácidas reunidas se alcalinizaron (NH₄OH conc., pH 10) y agotaron con cloroformo (3 veces con 50 ml. cada lavado). La solución clorofórmica fue secada (con Na₂SO₄ anhi.), filtrada y evaporada -- (evaporador rotatorio).

2. Muestra B.

Se repitió el proceso anterior con 1.400 grs. de planta seca, obteniéndose 66.4 grs. de extracto metanólico (4.74%).

3. Estudio cualitativo de los alcaloides y N óxidos.

Se analizaron las mezclas de alcaloides crudos por cromatografía en capa fina (placas de sílica gel G Merck; 20 x 20 cms) usando como solvente CHCl₃/MeOH/NH₄OH conc. 85-14-1.

Las placas fueron relevadas con reactivos de Dragendorff (4).

/...

III. RESULTADOS

A. Estudio clínico.1. Historia clínica:

Diecinueve animales (14 vacas, 1 toro y 4 terneras) de raza Holando habían permanecido de 2 a 3 meses en una pradera de un año de implantada, a base de alfalfa. En la misma se observó predominio de E.P. que manifestaba evidencias de haber sido comido; las demás plantas existentes se muestran en la tabla 2.

De estos animales enfermaron las 14 vacas, muriendo una de ellas.

2. Sintomatología:

Al concurrir al establecimiento los animales hacían 5 a 6 días - que estaban aparentemente afectados. El síndrome correspondía al de una fotosensibilización hepatógena, colectiva, observándose - los siguientes síntomas:

Blefaritis, ulceración del tercer párpado, conjuntivitis, queratitis, corrimiento ocular purulento o seroso, morros con costras y exudados, sialorrea, rechimiento de dientes, lesiones ulcerativas de fotosensibilización en el tercio superior de la cara inferior de la lengua, producida por la exposición al sol durante el lamido de los ollares.

Dermatitis en ubres y pesones, en las partes no pigmentadas y expuestas al sol. Mucosas ictericas, costras en vulva, miembros anteriores edematosos. El sensorio se notó deprimido. Al movilizar los animales para su estudio clínico, adoptaron posiciones de decúbito, manteniéndose en esa posición largo tiempo.

B. Estudios bioquímicos (Ver tabla N° 1).C. Patología.

A la necropsia lo más llamativo resultó una ictericia generalizada en mucosa, tejido celular subcutáneo y cavidad abdominal.

Edema en tejido conjuntivo subcutáneo, hígado friable, con un color amarillo ocre en todo el parénquima hepático.

HISTOPATOLOGIA: en hígado se observó necrosis periacinar, presentándose todos los hepatocitos aumentados de 2 a 5 veces su tamaño (megalocitosis). Algunas de estas células eran multinucleadas llegándose a observar hasta 5 núcleos por célula. El núcleo de los megalocitos se observa aumentado de tamaño, con una membrana

nuclear bien coloreada por la hematoxilina, cromatina escasa y fragmentada y presencia de uno o dos nucleolos aumentados de tamaño. El citoplasma presentaba degeneración hidrópica, en algunas células infiltración de pigmentos biliares y en otros glóbulos citoplasmáticos eosinofílicos que se teñían positivamente con el P.A.S. La estructura trabecular de los cordones hepáticos estaban distorsionadas debido a la megalocitosis.

En las venas centro-lobulillares se apreciaban acúmulos de células en la luz, algunas de las cuales eran histiocitos repletos de hemosiderina.

En endotelio vascular se observa proliferación y tumefacción de las células. Los espacios periportales mostraban acúmulos de células mononucleares, células similares a las del epitelio biliar indicativas de que los canaliculos biliares comenzaban a proliferar y fibroblastos con moderada formación de tejido fibroso. En el parénquima hepático había proliferación de células de Kupffer.

En el S.N.C., riñón y pulmón, no se observaron lesiones significativas.

D. Clasificación botánica de las plantas recolectadas en la pradera. (Ver Tabla N° 2).-

E. Estudio ecológico de la pradera.

No se observó la presencia del hongo *Pithomyces chartarum* (Berk & Curt) M.B. Ellis en los panes de pradera analizados.

F. Determinación de alcaloides pirrolizidínicos.

1. Muestra A:

EXTRACCION DE ALCALOIDES:

El rendimiento final fue de 0.501 grs. (0.10%) sobre hojas secas.

OBTENCION DE LOS N OXIDOS:

Se observó así un residuo de alcaloides correspondientes a los N óxidos presentes en la planta (50 mg. aproximadamente el 0.01% sobre las hojas secas).

2. Muestra B:

EXTRACCION DE ALCALOIDES:

28 mg. de alcaloides crudos (0.002% sobre la planta seca).

OBTENCION DE N- OXIDOS:

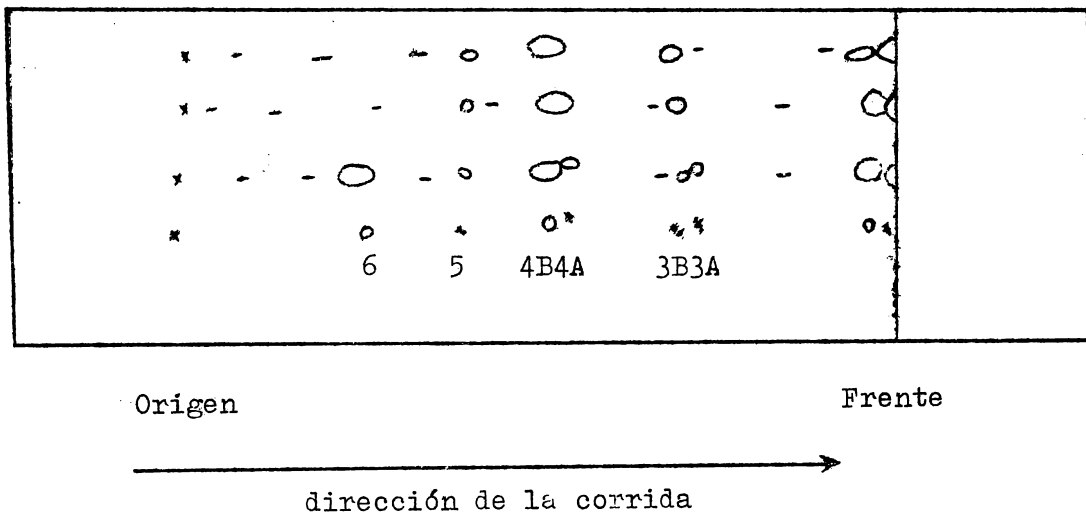
Solamente se obtuvieron trazas de N óxidos.

130

3. Estudio cualitativo de los alcaloides y N óxidos.

Se observó la presencia de 5 alcaloides terciarios tanto en la muestra A como en la B. Los mismos alcaloides forman parte de los N óxidos donde también existen 3 componentes suplementarios. Los alcaloides más abundantes (manchas 2 y 4 B) pueden ser identificados tentativamente como echiumina y echimidina (Figura 1)

FIGURA 1. Corrida de la cromatografía en capa fina de las mezclas de alcaloides.-



IV. DISCUSION

El cuadro clínico observado fue el característico de una fotosensibilización hepatógena.

Al estudio bioquímico los valores de bolirrutina total en la mayoría de los animales estudiados resultaron estar por encima de los valores normales, índice de la ictericia presente en los mis mos.

Los valores de SGOT también estuvieron en varios animales por en cima de los valores normales, manifestándose en mayor grado en la vaca que posteriormente murió, a pesar de que los valores de esta enzima responden a la destrucción de tejidos, debe tomarse en este caso como indicativo de la lesión hepática encontrada.

Los resultados del hematocrito en general estuvieron dentro de los límites normales.

Las lesiones histológicas del hígado fueron similares a las producidas por los alcaloides pirrolizidínicos en ruminantes y anima

Jornadas de Buiatría. V Uruguayas
15 al 18 de junio de 1977 - Paysandú, Uruguay

les de laboratorio indicando una intoxicación subaguda caracterizada por necrosis periácinar y ausencia de marcada proliferación de canaliculos biliares y tejido fibroso.

La megalocitosis a pesar que puede ser producida por otros agentes hepatotóxicos es considerada por Bull et al. como patognomónica de la intoxicación por animales en pastoreo (2). La presencia en Hígado de células multinucleadas en la intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos es mencionada únicamente por Smith Jones y Hunt (14), siendo también encontrada en riñones de ratas intoxicadas experimentalmente con dehydroheliotridina, un metabolito de los alcaloides pirrolizidínicos con base heliotridina(9).

De la observación primaria de la pradera resaltaba el predominio de E.P., con evidencia de haber sido ingerido.

Se descartaron los Senecios que han sido descritos como capaces de contener esta misma familia de alcaloides por no mostrar ningún indicio que los animales lo hubiesen consumido.

Los géneros *Solanum* spp., *Gnaphalium* spp., *Raphanus* spp., *Carduus* spp., pueden acumular nitratos pero esta sintomatología y patología no coinciden con el cuadro descrito (6).

Para el género *Artemisia* (especie *A. marítima*) los síntomas que se describen están relacionados principalmente con estimulación del S.N.C. (5).

El género *Raphanus* puede contener en su semilla aceites semejantes al de la mostaza, pudiendo contener un glucósido similar a la sinalbina. La sintomatología y patología descritas son distintas a la observada para el caso clínico (6, 15).

Medicago sativa: en ciertas condiciones puede causar fotosensibilización debido a la ocurrencia transitoria de un agente fotodinámico (1).

El *Ammimajus* ha sido descrita en nuestro país como planta fotosensibilizante primaria no produciendo síntomas de insuficiencia hepática (13).

Género *Matricaria*: (especie *M. nigellaefolia*), cuando es tóxica causa una afección diferente a la observada (6).

La determinación química de alcaloides pirrolizidínicos de E.P. de la pradera tóxica dió una concentración del 0.10% sobre la planta seca, mientras que el *E. plantagineum* del predio del C.I. VET. "Miguel C. Rubino", dió una cantidad mucho menor, siendo solamente del 0.002% de planta seca.

La variabilidad en el contenido de alcaloides según la estación, el tipo de terreno, y otros factores, está bien demostrada para estas plantas (2). Lo que explica el hecho que la planta resulte tóxica solamente en determinadas condiciones, cuando posee mayor

contenido en alcaloides pirrolizidínicos, como sucedió en la muestra de la pradera tóxica.

Los alcaloides identificados como echiumina y echimidina han sido descritos en el E.P. demostrando su hepatotoxicidad (2).

En otros miembros de esta tribus se han encontrado Equimidina(2) y Heliosupina (7).

Varias otras tribus de la familia Boraginaceae contienen alcaloides de este tipo (2). En *Echium* no se había descrito la presencia de N óxidos.

Características botánicas de *Echium plantagineum* y ciclo vegetativo en el Uruguay.-

Planta pilosa hasta hirsuta, cuando fructificada de aproximadamente 60-80 cms. de alto. Plántula arrossetada de hojas ovoides integras. Crecimiento inicial arrossetado con hojas basales percioladas elíptico-obovoides de tamaño variable según fertilidad del suelo. Los tallos floríferos se desarrollan a fines de invierno y llevan hojas progresivamente lanceoladas, ligeramente abrazadas en la base; flores de corola tubulosa pentalobada, de color violáceo, rara vez blanca, de 2 a 3 cms. de longitud, dispuestas en espigas o panojas hacia el ápice de los tallos. Fruto bicarpe lar que al madurar se divide en 4 clusas uniseminadas, rugosas apiculadas de aproximadamente 2.5 mm. de longitud, muy frecuentes como impurezas en granos de cereales. En condiciones de corte o pastoreo los tallos pueden florecer y fructificar a baja altura.

Especie europea, adventicia en el Río de la Plata, de ciclo anual invernal, germina desde principio de otoño y florece en primavera aunque se encuentran ejemplares florecidos aún a fines de mayo.

Maleza muy frecuente en el país en cultivos invernales y rastrojos donde, llega a ser dominante. Es comida por el ganado principalmente ovino, cuando la planta es joven, y muy poco apetecida cuando madura.

Tiende a desaparecer en los rastrojos regenerados y campos de pastoreo donde se mantiene como especie frecuente pero accesoria.

En praderas artificiales, invernales (tréboles, ryegrass, etc.) puede dominar inicialmente y resulta muy difícil su erradicación por ser menos apetecida que las forrajeras. Los herbicidas a base de 24 D y MCPA la controlan pero su efecto sólo es eficaz en estados jóvenes.

Se han registrado fracasos serios en tratamientos en trebolares-tratados tardíamente con 24DB.

E. Plantagineum es la única especie del género citada para el Uruguay y la Provincia de Buenos Aires pero en Europa hay unas 18 especies. Esta especie presenta en Uruguay diversidad de formas en cuanto a tamaño de flor, altura, etc., que posiblemente se deba no solamente a factores ambientales sino a variación genética. Fiori cita sólo para Italia 4 variedades (5).

V. CONCLUSIONES

La ingestión de *Echium plantagineum* conteniendo un 0.12 % sobremateria seca de echiunina y echimidina produjo en bovinos un cuadro de fotosensibilización hepatógena. Los hallazgos histológicos del hígado mostraron la presencia de megalocitosis, lesión - considerada característica de la enfermedad en animales en pastoreo.

El contenido de alcaloides relacionado con la toxicidad de esta planta es variable dependiendo de múltiples factores, características del suelo, época del año, fertilización, clima.-

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Falco, la colaboración prestada.

Se agradece a los ayudantes técnicos del C.I.Vet., Alfredo Ruiz, María A. Paglia, Mirta Souto y Carlota Cáceres, por los trabajos realizados.

Dr. Moyna y P. Altamirano agradecen las donaciones de equipo de la Embajada Británica y de la Canadian International Deustopmery Agency que hicieron posible la parte química del trabajo.-

ABLA N° 1. Determinaciones de bilirrubina (total, directa e indirecta), SGOT y hematocrito en animales con sintomatología.-

Muestras	SGOT	B.Total	B.directa	B.indirecta	Hematocrito
	u.i.	mg %	mg %	mg %	%
1	115	3.36	1.28	2.08	--
2	225	--	--	--	32
3	75	1.16	0.23	0.93	--
4	65	1.51	0.35	1.16	--
5	135	3.71	1.28	2.43	24
6	100	0.23	0.12	0.11	--
7	150	3.71	1.39	2.32	29
8	125	3.13	0.81	2.32	--
9	150	--	--	--	25
Vaca que murió	655	--	--	--	--

- Faltan datos por encontrarse las muestras de sangre en mal estado.

*

ABLA N° 2. Clasificación botánica de las plantas recolectadas de la pradera.-

Plantas recolectadas	Familias
Echium plantagineum	Boraginaceae
Hymeranthus sp.	Solanaceae
Solanum sisymbriifolium	"
Senecio brasiliensis	Compositae
Senecio selloi	"
Matricaria chamomilla	"
Gnaphalium spicatum	"
Carduus mutans	"
Cardo de Castilla	"
Baccharis notoserigila	"
Artemisia sp.	"
Ammi majus	Umbelliferae
Cerastium sp.	Caryophyllaceae
Raphanus sativus	Cruciferae
Medicago sativa	Leguminosae

BIBLIOGRAFIA

1. BLOOD, D.C.; Henderson, J.A. Veterinary Medicine Fourth Edition Ballière Tindall, London 1974. pp. 964.
2. BULL, L.B.; Culvenor, C.C.; Dick, A.T. The Pyrrolizidine - Alkaloids. North Holland Publishing Company Amsterdam 1968. pp. 293.
3. DINGLEY, J.M.; N.Z.J. Ag. Res. 5 : 49-61 (1962).
4. DYEING REAGENTS FOR T.L. and P.C. E. Merck & Co. 1974. Darmstadt. Reactivo N° 132.
5. FIORI, A. Nuova Flora Analitica D'Italia. Firenze 1929.
6. GARNER TOXICOLOGIA VETERINARIA REVISADA por Clarke, E.G.C. y Clarke, M.L. Traducida Tarazova Vilas, J.M. Tercera Edición. Acribia - España (1970). pp. 740.
7. MAN'KO, I.V. Farm. Zhur (Kiev) 19 :22 (1964). Chem.Abstr. 64 : 4125 (Resumen).
8. MARZOCCA, A.; Marsico, O.; Del Puerto, O. Manual de Malezas. Hemisferio Sur. Buenos Aires (1975).
9. PETERSON, J.E.; Adele, S.; Marjori, F.V. J.Path. 107:175-189 (1972).
10. PODESTA, M. et al. IV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, 16-18 de junio 1976. pp. iii/1 - iii/18.
11. ROSENGURTT, B. Estudios sobre praderas naturales. 5ta. contribución. (1946).
12. RIET ALVARIZA, F. y Días, L.E. II Jornadas Uruguayas de -- Buiatría. Paysandú, 19-21 de junio 1974.
13. RIET ALVARIZA, F. et al. III Jornadas Uruguayas de Buiatría Paysandú, 17-19 de junio 1975.
14. SMITH, H.L.; Jones, T.C.; Hunt, R.D. Veterinary Pathology. Fourth Edition LEA Febiger Philadelphia (1972).pp1521.
15. STEYN, D.G. The Toxicology of Plants in South Africa, Central News Agency, South Africa (1934). pp. 631.
16. ST. GEORGE-GRANBAUER, T.D.; Rac, R. Aus. Vet. J. 38; 288-293. (1962).
17. THORNTON, R.H. N.Z.J. Agri. Res. 6 : 318-319 (1963).