

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE *ECHIUM PLANTAGINEUM* EN BOVINOS**

**Por**

**PECHI SANTANA, Braihan Gustavo**  
**FERNÁNDEZ BONINO, Valentín José**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2018**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

**TESIS DE GRADO APROBADA POR:**

Presidente de mesa:

---

Dra. Alejandra Capelli

Segundo Miembro (Tutor):

---

Dra. Lourdes Adrien

Tercer Miembro:

---

Dr. Javier García

Co-Tutor:

---

Dr. Rodolfo Rivero

**FECHA:**

---

**20/12/2018**

**AUTORES:**

---

Braihan Gustavo Pechi Santana

---

Valentín José Fernández Bonino

## **AGRADECIMENTOS**

A nuestra tutora Dra. Lourdes Adrien por la oportunidad de realizar el trabajo, su dedicación y colaboración incondicional hacia nosotros y la profesión.

Al Dr. Rodolfo Rivero por su apoyo y conocimiento brindado.

A la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), desde los funcionarios de campo, hasta los laboratoristas, por su contribución en las tareas realizadas, así como el local y las instalaciones prestadas, donde se desarrollo el trabajo.

En particular a Ángel Colombino por su invaluable colaboración con el proyecto.

Al Dr. Dale Gardner y al Instituto "*Poisonous Plant Research Laboratory*", Utah, USDA por su colaboración en la determinación de alcaloides.

Al Laboratorio Regional Noreste de la DILAVE "Miguel C. Rubino" y todo su equipo de trabajo, por brindarnos la información solicitada en tiempo y forma, así como también la realización de diferentes análisis solicitados.

A nuestras familias y amigos, por acompañarnos y apoyarnos a lo largo de toda la carrera.

Y a todos los que colaboraron con nosotros de alguna u otra manera.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDOS.....	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Producción agropecuaria.....	11
2.2. Impacto de las plantas tóxicas en Uruguay.....	11
2.3. Definición de plantas tóxicas.....	12
2.4. Acción nociva de las plantas tóxicas.....	12
2.5. Factores que influyen en la toxicidad de las plantas.....	13
2.6. Plantas hepatotóxicas.....	13
2.7. Hígado y la respuesta del órgano a las agresiones.....	15
2.8. Características principales de <i>Echium plantagineum</i> .....	18
2.9. Alcaloides pirrolizidínicos en los rumiantes.....	19
2.10. Antecedentes regionales y en el país de intoxicación por <i>Echium plantagineum</i> .....	20
2.11. Diagnóstico de la intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos.....	21
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1. Procesamiento del <i>Echium plantagineum</i> .....	24
5.2. Experimentos realizados.....	25
5.2.1. Experimento N°1.....	25
5.2.2. Experimento N°2.....	27
5.3. Determinaciones en los animales.....	28
5.4. Biopsia hepática.....	28
5.5. Identificación y cuantificación de los alcaloides pirrolizidínicos de <i>Echium plantagineum</i> .....	29
5.6. Análisis estadístico.....	29
6. RESULTADOS.....	29
6.1. Experimento N°1.....	29
6.1.1. Parámetros clínicos y peso vivo.....	29
6.1.2. Enzimas hepáticas y metabolitos.....	32
6.2. Experimento N°2.....	35
6.2.1. Parámetros clínicos y peso vivo.....	35
6.2.2. Enzimas hepáticas y metabolitos.....	37
6.3. Biopsias hepáticas.....	41
6.3.1. Experimento N°1.....	41
6.3.2. Experimento N°2.....	43

6.4. Identificación y cuantificación de los alcaloides pirrolizidínicos de <i>Echium plantagineum</i> .....	46
7. DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIONES.....	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Páginas
Tabla 1. Tratamientos del experimento N°1.....	26
Tabla 2. Administración de <i>Echium plantagineum</i> en el experimento N°1..	26
Tabla 3. Tratamientos del experimento N°2.....	27
Tabla 4. Administración de <i>Echium plantagineum</i> en el experimento N°2	27
Tabla 5. Experimento N°1: hallazgos histológicos en biopsias hepáticas de animales intoxicados con <i>Echium plantagineum</i> y animales controles negativos.....	42
Tabla 6. Experimento N°2: hallazgos histológicos en biopsias hepáticas de animales intoxicados con <i>Echium plantagineum</i> y animales controles negativos.....	44
Tabla 7. Concentración de los alcaloides pirrolizidínicos encontrados en las muestras de <i>E. plantagineum</i> de distintos orígenes.....	47
Figura 1. <i>Echium plantagineum</i> en estado de floración en Estación experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”.....	18
Figura 2. <i>Echium plantagineum</i> en estado vegetativo en Estación experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”.....	18
Figura 3. Hojas y tallos de <i>Echium plantagineum</i> a temperatura ambiente para el secado inicial.....	25
Figura 4. Molino de forraje “Wiley Mill”, modelo standard N°3. Plantas siendo procesadas en molino de forraje.....	25
Figura 5. Frecuencia respiratoria en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	30
Figura 6. Frecuencia cardíaca en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	30
Figura 7. Temperatura rectal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	31
Figura 8. Frecuencia ruminal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	31
Figura 9. Peso vivo en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	32
Figura 10. Concentración de proteína total en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	32
Figura 11. Concentración de albúmina sérica en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	33
Figura 12. Concentración de Gamma glutamiltransferasa (GGT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	33
Figura 13. Concentración de Aspartato aminotransferasa (AST) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	34
Figura 14. Concentración de Alanina aminotransferasa (ALT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	34
Figura 15. Concentración de fosfatasa alcalina en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	35
Figura 16. Frecuencia respiratoria en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	35
Figura 17. Frecuencia cardíaca en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	36

Figura 18. Temperatura rectal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	36
Figura 19. Frecuencia ruminal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	37
Figura 20. Peso en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	37
Figura 21. Concentración de proteína total en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	38
Figura 22. Concentración de albúmina sérica (ALB) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	38
Figura 23. Concentración de gamma glutamil transferasa (GGT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	39
Figura 24. Concentración de aspartato aminotransferasa (AST) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	39
Figura 25. Concentración de Alanina aminotransferasa (ALT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	40
Figura 26. Concentración de fosfatasa alcalina en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).....	40
Figura 27. Hígado (10X). Infiltrado inflamatorio en la región mediozonal en ternero que consumió <i>Echium plantagineum</i> en el Experimento 1.....	45
Figura 28. Hígado (100X). Infiltrado inflamatorio en la región periportal en ternero que consumió <i>Echium plantagineum</i> en el Experimento 2.....	45
Figura 29. Estructura química de los alcaloides identificados en las muestras de <i>Echium plantagineum</i> .....	46

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar si *Echium plantagineum* resulta tóxica en bovinos a determinadas dosis, mediante la reproducción experimental, así como conocer el tipo y la concentración de los alcaloides pirrolizidínicos de la planta. Se realizaron dos experimentos. En el Experimento N°1 se utilizaron cuatro terneros raza Holando, distribuidos al azar en dos tratamientos (Tratamiento A: *E. plantagineum* y Tratamiento control negativo). Los animales del Tratamiento A, recibieron 200g de planta seca/animal/día, el día 0, y desde el día 28 a 32, 500g de planta seca/animal/día, totalizando una dosis de 14g/kg de peso vivo. La planta fue administrada mediante la utilización de una sonda buco-esofágica. El tratamiento control, no recibió la planta. En el Experimento N°2, también se utilizaron 4 terneros, de la raza Holando, que fueron distribuidos al azar en dos tratamientos (Tratamiento B: *E. plantagineum* y Tratamiento control negativo). A los animales del Tratamiento B, en el día 0 y 1 se les suministró 200g/animal/día de planta seca y a partir del día 7 se le suministró 100g/animal/día hasta el día 31 del experimento. La dosis total recibida por los animales del tratamiento B fue de 14,3 g/kg de peso vivo. En este experimento, la planta seca y molida, fue suministrada, mezclada con el concentrado. En los animales de ambos experimentos se evaluaron los parámetros clínicos, temperatura rectal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, frecuencia ruminal, coloración de las mucosas. Se realizó además la extracción de sangre para evaluar el funcionamiento hepático a través de la medición de enzimas séricas y otros metabolitos sanguíneos. Se estudiaron las posibles lesiones hepáticas a través del estudio histológico de biopsias de hígado. En ambos experimentos, los animales no tuvieron alteraciones clínicas, ni subclínicas indicativas de daño hepático. En las plantas de *E. plantagineum* se determinó la presencia y la concentración de los alcaloides 7-angelilretoecina, licopsamina, intermedina + otros isómeros, echiumina y echimidina. Los resultados de este trabajo pueden estar explicados, por las dosis de planta suministradas por animal y por kg de peso vivo, que no fueron suficientes para provocar daños hepáticos, ni signos clínicos, y por el tipo y concentración de los alcaloides pirrolizidínicos que contenían las plantas de *E. plantagineum* utilizadas.



## SUMMARY

The objective of this research was to determine if *Echium plantagineum* is toxic at certain doses used to bovines, through experimental reproduction, as well as to know the type and concentration of pyrrolizidine alkaloids in the plant. Two experiments were performed. In Experiment No. 1, four Holstein calves were used, randomly distributed in two treatments (Treatment A: *E. plantagineum* and Negative control treatment). The calves of Treatment A received on day 0, 200g of dry plant/animal/day and from day 28 to 32 of the experiment they received 500g of dried plant/animal/day, totaling a dose of 12.2g/kg of dry plant of live weight. The plant was administered using an oral-esophageal catheter. The control treatment, did not receive the plant. In Experiment No. 2, also four Holstein calves were used, randomly distributed in two treatments (Treatment B: *E. plantaguineum* and Negative control treatment). The animals of Treatment B, on day 0 and 1 were given 200g/animal/day of dry plant and from day 7 to 31 were given 100g/animal/day of dry *E. plantaguineum*. The total dose received by the animals of treatment B was 15 g/kg of dry plant of live weight. In this experiment, the dried and ground plant was supplied mixed with the concentrate. In the animals of both experiments, clinical parameters, rectal temperature, heart rate, respiratory rate, ruminal frequency, coloration of the mucous membranes were evaluated. Blood extraction was also performed to evaluate liver function through the measurement of serum enzymes and other blood metabolites. Possible hepatic lesions were studied through the histological study of liver biopsies. In both experiments, the experimental reproduction of *E. plantagineum* intoxication was not achieved. The animals had no clinical or subclinical alterations indicative of liver damage. In the plants of *E. plantagineum* the presence and concentration of the alkaloids 7-angelilretoecina, licopsamine, intermedine + other isomers, echiumine and echimidine was determined. The results of this work may be explained, probably due to the doses of plants supplied per animal and per kg of live weight, which were not enough to cause liver damage or clinical signs, the type and concentration of pyrrolizidine alkaloids that contained the plants of *E. plantagineum* used in this experiment.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

La problemática de intoxicación por consumo de plantas con principios tóxicos constituye una de las principales causas de pérdidas en los sistemas ganaderos. Rivero y col. (2009) afirman que las plantas tóxicas que afectan ovinos y bovinos en Uruguay son 31 especies pertenecientes a 26 géneros, aunque hay quienes sostienen que son más las plantas implicadas en dichas causas, reconociendo un total de 40 especies de 30 géneros diferentes. (Moraes y col., 2009). Pero además, García y Santos y Capelli (2016) en una revisión reciente reportan un número importante de plantas tóxicas que no habían sido diagnosticadas previamente en rumiantes.

La importancia de las plantas tóxicas es de interés por las pérdidas económicas de la producción ganadera de nuestro país. Estudios indican que pueden llegar a una mortalidad estimada de hasta un 7%. Su impacto ha sido estudiado en Brasil y Uruguay, estimándose en Brasil un 14 % de pérdidas productivas, y en Uruguay un 5% (representando 98.000 cabezas de ganado y un valor de U\$S 19.600.000) (Riet-Correa y Medeiros, 2001).

Las pérdidas económicas pueden dividirse en dos grandes grupos: pérdidas directas y pérdidas indirectas. Las primeras corresponden a la muerte de animales, disminución de su índice reproductivo (infertilidad, aborto y muerte perinatal) y productivos en los animales recuperados, repercutiendo en menor ganancia de peso y susceptibilidad ante otras enfermedades. Las pérdidas indirectas tienen incidencia en el costo del tratamiento, costo de manejo (control y prevención de la intoxicación), pérdidas de forrajes por contaminación, reposición de animales muertos y gastos asociados al diagnóstico (Riet-Correa y Medeiros., 2001, citado por Riet-Correa y col., 2007).

Dentro de las plantas tóxicas, las que producen lesión hepática, tanto aguda como crónica (necrosis y fibrosis hepática) son las más importantes en Uruguay. Estas son *Cestrum parqui* (Duraznillo negro) y *Senecio* spp. Además, existen otras plantas reportadas en la bibliografía que también producen cuadros de fibrosis hepática, por el contenido de alcaloides pirrolizidínicos, pero con escasos reportes de brotes naturales. Una de éstas plantas es el *Echium plantagineum*, presente en el país y que fue asociada a un brote natural de intoxicación en bovinos en el Departamento de Río Negro. En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo comprobar la probable intoxicación por *Echium plantagineum* asociado a la mortandad de terneros en dicho predio y el estudio clínico patológico luego de la ingestión de cantidades conocidas de la planta.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Producción agropecuaria

La producción agropecuaria en el Uruguay se desarrolla en un área de 16357 mil hectáreas y de este total un 40% (6467 mil ha) son dedicadas a la ganadería, siendo este el principal rubro. El segundo rubro de importancia corresponde a la agricultura de secano con un 30% de la superficie (4928 mil ha), las arroceras ocupan un 11% (1836 mil ha), forestación 15% (2448 mil) quedando un 2% (344 mil has) para la lechería y similar porcentaje para la agricultura intensiva (336 mil has) (Anuario Estadístico Agropecuario, 2016).

En el ejercicio agrícola de los años 2017-2018 la población vacuna del Uruguay fue de 11.739.000, produciendo 1045 toneladas de carne en pie. En cuanto al rubro ovino, para el mismo ejercicio, fue de 6.565.000 animales, dejando una producción de 68 mil toneladas de carne en pie y 25.497 toneladas de lana (base sucia), (Anuario Estadístico Agropecuario, 2018).

### 2.2. Impacto de las plantas tóxicas en Uruguay

En los Laboratorios de Diagnóstico de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), los casos reportados de intoxicación por plantas tóxicas en bovinos corresponden a un 10%, según el Laboratorio Regional Noroeste de Paysandú, y a un 16% para el Laboratorio Regional Este de Treinta y Tres (García y col., 2016). En cuanto a ovinos los casos reportados corresponden a un 11% en la región noroeste y 15% en el este (Rivero y col., 2011). Los aportes de las tesis de grado de la Facultad de Veterinaria también han contribuido al reconocimiento de las plantas tóxicas y ha incrementado su número, algunas de éstas incluidas en el trabajo de Rivero y col. (2011) y algunas otras estudiadas posteriormente (García y col., 2016).

Tomando como referencia el análisis de intoxicaciones asociadas a plantas tóxicas, micotoxinas y otros compuestos realizados por el Laboratorio DILAVE "Miguel C. Rubino" ubicado en la región Este, durante los años 1995- 2015, se han reportado varios episodios de intoxicación que afectaron bovinos en dicha región. Un total de 294 focos fueron de origen tóxico, resultando el 15% del total de diagnósticos. Dentro de los departamentos involucrados se encuentran: Cerro Largo y Treinta y Tres (29% cada uno), Lavalleja (19%), Rocha (15%), Durazno (3%), Maldonado y Florida (2%). De los focos por causas tóxicas, el 67 % corresponde a plantas tóxicas, 11% al uso inadecuado de productos veterinarios o aditivos, 7% a micotoxinas, y un 15% no se identificó etiología. Además, en este último trabajo se determinó que la intoxicación más diagnosticada fue por consumo de *Senecio spp*, la cual ha crecido en los últimos cinco años, posiblemente asociado al menor stock ovino en Uruguay y a una mayor invasión de la planta en los campos en la región de Cerro Largo desde el Brasil. (García y col., 2016)

Dentro de las plantas tóxicas de la región Noroeste con mayor registro de intoxicación se encuentra *Cestrum parqui* con un total de 66 focos y *Senecio spp*. con 75 focos, observándose un marcado aumento de intoxicaciones para el período comprendido entre 2004- 2017, dado por factores predisponentes

como sequía, carencia de forraje, alta carga, períodos de privación de alimento (DILAVE, comunicación personal)

### **2.3. Definición de plantas tóxicas**

Las plantas tóxicas de interés pecuario, se definen como aquellas que al ser ingeridas por animales, provocan daños en la salud e incluso la muerte de los mismos (Tokarnia y col., 2012). Es así, que para ser incluidas como “plantas tóxicas de interés pecuario”, deberá ser su toxicidad comprobada experimentalmente con animales. Hay muchas diferencias de susceptibilidad en diversas especies, es por eso que el resultado obtenido de una especie animal no puede ser simplemente extendido a otra (Tokarnia y col., 2000).

Por esta razón, no todas las plantas demostradas experimentalmente como tóxicas, deben ser consideradas “plantas tóxicas de interés pecuario”, por el simple hecho de que no todas son ingeridas por los animales: sólo se puede incluir aquellas plantas que produzcan cuadros clínicos-patológicos que ocurran en condiciones naturales (Tokarnia y col., 2000).

La ocurrencia de las intoxicaciones depende de muchos factores epidemiológicos tales como las condiciones climáticas, el suelo y el manejo que se haga de las pasturas, el laboreo de la tierra, siembra y fertilización y por último, de la difusión de la planta (Riet-Correa y col., 1991).

### **2.4. Acción nociva de las plantas tóxicas**

Para generar efectos nocivos, las plantas tienen que ser ingeridas en ciertas cantidades en relación al peso del animal. Estas cantidades pueden ser expresadas en gramos de plantas por kilogramos del peso animal (g/kg) o en porcentajes de plantas en relación al peso animal.

De acuerdo a su acción, las plantas tóxicas pueden separarse en dos grupos: en el primero se encuentran las plantas con acción directa, que son aquellas que tienen repercusión sobre el tracto digestivo y corresponden a la minoría. En el segundo grupo se ubican las plantas de acción remota, las cuales no afectan el tracto digestivo, siendo absorbidas por la mucosa y a través de la circulación enterohepática. Antes de ser absorbidas pueden darse dos procesos tóxicos: que la microflora ruminal pueda modificar su toxicidad por efecto de la degradación o la fijación de las toxinas; también transformar precursores inofensivos o de baja toxicidad en sustancias tóxicas o aún más tóxicas.

Para la eliminación de los principios tóxicos, el organismo tiene distintas vías, que pueden ser el hígado, la mucosa intestinal, la orina, el sudor, la leche, o a través del aire expirado. Los principios tóxicos pueden ser absorbidos y eliminados con rapidez en intervalos cortos de tiempo (agudo), mientras que para otros su eliminación puede ser más lenta (crónico), quedando retenidos en el organismo, pudiendo alcanzar niveles tóxicos y causando la muerte (Tokarnia y col., 2012).

De acuerdo al tipo de acción, las plantas pueden afectar el funcionamiento cardíaco, digestivo, hepático, renal, del sistema nervioso, reproductivo, respiratorio, pueden producir degeneración y necrosis muscular, fotosensibilización, o calcificación sistémica, habiendo también plantas cianogénicas y otras que causan intoxicación por nitritos y nitratos, y por oxalatos (Tokarnia y col., 2012).

## 2.5. Factores que influyen en la toxicidad de las plantas

Dentro de los factores que influyen en la toxicidad se encuentran los ligados a la planta y los ligados al animal (Tokarnia y col., 2012).

Los que se vinculan a la planta son:

- Fase de crecimiento: algunas de las plantas son más tóxicas en brotación (plantas cianogénicas). Ocurre también lo contrario en plantas maduras como es el caso de *Baccharis coridifolia*.
- Partes tóxicas: en la mayoría las partes tóxicas son las hojas, en algunas los frutos, y en otras ambas partes.
- Estado: fresca o seca. Algunas pierden su toxicidad por el secado (cianogénicas), mientras que otras mantienen su principio activo durante períodos de tiempo prolongados.
- Suelo y procedencia: la fertilidad y composición del suelo puede ser uno de los factores que influyen en la toxicidad.

Factores ligados al animal (Tokarnia y col., 2012):

- Especie animal: las diversas especies animales no tienen la misma sensibilidad a la acción tóxica de muchas plantas.
- Edad: Se puede ver que en algunas especies de plantas hay una respuesta distinta entre jóvenes y adultos.
- Pigmentación: los animales de piel blanca son más sensibles a plantas que causan fotosensibilización.
- Ejercicio: puede ser un factor decisivo para llevar al animal a la muerte, debido a las plantas que interfieren en el funcionamiento del corazón y/o en el sistema nervioso central.
- Tolerancia e inmunidad. La tolerancia se refiere al aumento de resistencia a una determinada sustancia de naturaleza no proteica y la inmunidad por su parte, está relacionada a la producción de antitoxinas específicas contra principios tóxicos de naturaleza proteica, por parte del sistema inmune.
- Resistencia individual: hay evidencia de que puede tener influencia para plantas tóxicas.

## 2.6. Plantas hepatotóxicas

Estas plantas ocasionan diferentes lesiones, cuadros agudos, cuadros crónicos y de fotosensibilización hepatógena. En cuadros agudos se observan áreas de necrosis centrolobulillar, periacinar y mediozonal. Dentro de este grupo, se encuentran plantas tales como por ejemplo *Cestrum parqui*, *Xanthium* spp,

entre otras (Tokarnia y col., 2012). En los cuadros crónicos predominan lesiones de fibrosis y megalocitosis y pueden ser producidos por plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos (*Senecio* spp., *Echium plantagineum*, *Crotalaria* spp.), (Tokarnia y col., 2012). En los casos de fotosensibilización hepatógena, las lesiones se encuentran en los canalículos biliares y en el parénquima hepático (Tokarnia y col., 2000).

En el cuadro agudo, se puede producir necrosis centrolobulillar de los hepatocitos. Esa porción del lóbulo recibe sangre menos oxigenada, por lo tanto, es susceptible a hipoxia y tiene mayor actividad enzimática capaz de activar compuestos en formas tóxicas. La necrosis centrolobulillar puede resultar de una anemia grave o aguda, o de una insuficiencia cardíaca directa. De forma semejante, la congestión pasiva del hígado resulta en hipoxia como resultado de estasis de sangre y produce atrofia de los hepatocitos centrolobulillares. También se puede producir necrosis periacinar. Este tipo de necrosis envuelve la vena central ya que solamente la periferia del acino está afectada, reflejando típicamente la acción de una toxina de acción directa que requiere bioactivación, o anemia aguda o grave. Por último, también podría producirse necrosis mediozonal, que no son lesiones comunes, pero si lo son en suinos y equinos con aflatoxicosis. (McGavin y Zachary, 2009).

Dentro de las plantas que producen efectos hepatotóxicos agudos se encuentran: *Cestrum parqui* y *Xanthium cavanillesi* (Riet- Correa y col., 2007). La intoxicación por *Cestrum parqui* (“Duraznillo negro”) afecta a todas las especies, aves, suinos, equinos y bovinos. Se produce generalmente en primavera y son diversos los factores que influyen para que se dé, tales como, variaciones en el ciclo vegetativo de planta, épocas del año, hambre, carencia de forraje, transporte. El principio activo aún no está totalmente establecido, pero se considera a los carboxiatractilosídeos como el principal compuesto causante de su toxicidad (Riet- Correa y col., 2007).

*Xanthium cavanillesi* (“Abrojo Grande”), su intoxicación ha sido observada en bovinos, suinos, pero también puede ocurrir en ovinos, equinos y aves. Ésta ocurre con la ingesta de la planta o con brotes en fase cotiledónea que son más palatables, siendo estos la única parte tóxica (la semilla también es tóxica pero es raramente ingerida dado que se encuentra dentro del abrojo). El principio activo de esta planta es igual al que se encuentra en la planta anterior, y la intoxicación ocurre en épocas con poca disponibilidad de forraje (Riet- Correa y col., 2007).

Los signos clínicos correspondientes a estas dos plantas son de evolución aguda con un curso clínico de 12 a 72 horas y se caracterizan por agresividad, anorexia, paresia del tren posterior, incoordinación, temblores musculares, atonía ruminal, dolor abdominal, heces resacas con moco y estrías de sangre. En decúbito esternal presentan cólicos, gemidos, golpean la cabeza contra el suelo, movimiento de pedaleos y salivación (Riet- Correa y col., 2007).

Dentro del cuadro de fotosensibilización hepatógena se encuentran: *Lantana cámara* y *Myoporum laetum*, entre otras (Riet- Correa y col., 2007).

La intoxicación por *Lantana camara* (“Banderita española”) ha sido diagnosticada en ovinos y bovinos en Uruguay (Rivero y col. 2011). La enfermedad ocurre principalmente en animales transportados a áreas invadidas por la planta, por desconocimiento de la misma o por carencias forrajeras. Tiene como principio activo Lantadeno A y B (Riet- Correa y col., 2007).

La intoxicación por *Myoporum laetum* (“Transparente” o “cerca viva”) ocurre cuando animales ingieren hojas de gajos caídos por el viento o de plantas podadas. Puede también ocurrir por la ingesta directa desde los árboles que están al alcance de los animales durante el invierno, cuando hay poca disponibilidad de forraje. Los principios tóxicos de la planta son aceites esenciales furanosesquiterpenos (Riet- Correa y col., 2007).

Los signos clínicos que presenta la fotosensibilización hepatógena se caracterizan por anorexia, depresión, disminución de los movimientos ruminales, heces secas, presentan signos de dolor, también se observa después de unos días, edemas localizados principalmente en miembros, sialorrea, orina de color marrón oscuro y fotosensibilización. Esta última se presenta inicialmente como una dermatitis localizada en hocico, ubre, y en áreas de pelo blanco con exudado amarillento, posteriormente áreas enrojecidas, exudados serosos, erosiones y costras. Después de 4 días la piel se presenta reseca, engrosada, y pudiéndose complicar por miasis (Riet-Correa y col., 2007).

## **2.7. Hígado y la respuesta del órgano a las agresiones**

El hígado es el mayor órgano interno del cuerpo y en herbívoros es aproximadamente el 1% del peso corporal. En neonatos de todas las especies el hígado representa un porcentaje mayor en comparación a los adultos. En rumiantes, el órgano se ubica hacia el lado derecho de la cavidad abdominal y una serie de ligamentos lo mantienen en esa posición. Éste recibe sangre de dos fuentes, de la vena porta que ofrece el 60% a 70 % del flujo total de sangre hepática, y el restante por la arteria hepática (McGavin y Zachary, 2009; Dyce y col., 1999). La sangre procedente de ambas fuentes se mezcla en las sinusoides, volviendo a la circulación general por las venas hepáticas, que desembocan en la vena cava caudal.

El hígado tiene superficie capsular lisa y el parénquima tiene tejido castaño-rojizo friable, divididos en lóbulos, siendo afinados en la periferia hasta formar bordes cortantes (McGavin y Zachary, 2009).

La subunidad funcional hepática son los lobulillos hepáticos que es una estructura hexagonal, con un largo de 1 a 2 milímetros. En el centro se encuentra la vena central (o centrolobulillar) que es una afluente de la vena hepática. En los ángulos del hexágono aparece la tríada portal, la cual contiene conductos biliares, rama de vena porta, y la arteria hepática. Dentro de éste se encuentran los hepatocitos, siendo las células que forman la mayor parte de este órgano (McGavin y Zachary, 2009; Maclachlan y Cullen, 1995).

El hígado cumple diversas funciones, entre ellas el metabolismo de la bilirrubina, de los ácidos grasos, de los carbohidratos, de los lípidos, de los

xenobióticos, síntesis de proteínas y función inmune (McGavin y Zachary, 2009).

Luego de la destrucción del parénquima hepático puede ocurrir regeneración del parénquima, además de la sustitución por fibrosis e hiperplasia biliar. La fibrosis es una de las manifestaciones más comunes de lesiones hepáticas crónicas. Teniendo en cuenta la capacidad de regeneración del hígado, igualmente la lesión causada puede ser suficientemente grave para ser letal. En el hígado fibrótico hay un cambio en la cantidad de la matriz extracelular y alteración en los tipos de colágeno y en su sitio de deposición. El hígado gravemente fibrosado puede contener hasta seis veces más de colágeno y proteoglicanos que el hígado normal. La fibrosis hepática se caracteriza por aumento de colágenos fibrilares, tipo I y III, y del colágeno no fibrilar XVIII en el espacio de Disse, en las áreas portales y en el área circundante a las venas centrales. De igual manera, se da el aumento de los componentes de la matriz extracelular, proteoglicanos, fibronectina, y ácido hialurónico. Las células estrelladas (células Ito o lipocitos) cumplen un papel importante en la fibrosis hepática. En el hígado normal, éstas células ocupan el espacio de Disse (posición subendotelial en los sinusoides), entre los hepatocitos. Se caracterizan por la presencia de grandes vacuolas conteniendo lípidos en su citoplasma y además desempeña la función de control del diámetro de los sinusoides y consecuentemente el flujo de sangre a través de éstos. En los casos en que el hígado sufre una lesión, las células estrelladas pasan por una transformación fenotípica progresiva: de las típicas células almacenadoras de lípidos, pasan a ser células con apariencia miofibroblástica que tienen la capacidad de sintetizar colágeno tipo I, III y IV (McGavin y Zachary, 2009).

El lugar donde se deposita el colágeno en el hígado tiene un impacto importante en la función hepática. La fibrosis perisinusoidal puede tener un efecto grave sobre la función hepática. En el lóbulo hepático, el sitio de fibrosis puede ser el indicativo del tipo de lesión. La agresión tóxica crónica produce con frecuencia fibrosis centrolobulillar (periacinar). Esa región es afectada porque los hepatocitos centrolobulillares son el sitio de metabolismo de la mayoría de los fármacos. La insuficiencia cardíaca directa de larga duración puede también causar fibrosis en ese sitio. La fibrosis periportal puede resultar de condiciones inflamatorias crónicas, o de un pequeño grupo de toxinas que afectan los hepatocitos periportales, dado que ellas no requieren del metabolismo de enzimas del citocromo p-450 para producir un metabolito perjudicial (McGavin y Zachary, 2009).

La fibrosis puede limitarse a lóbulos individuales, pero en lesiones más graves las áreas de fibrosis pueden ser más extensas. La fibrosis "en puente" implica una fibrosis que se extiende de un espacio porta a otro espacio porta, o del espacio porta a la vena central. Es más probable que la fibrosis en puente perjudique más a la función hepática que una fibrosis focal. Por lo tanto, todas las formas de fibrosis son suficientemente graves y llevan a una función perjudicial del órgano. Debido a la enorme capacidad de reserva del hígado, la fibrosis en general es bastante extensa antes de encontrar signos de disfunción.



Otros padrones de fibrosis pueden ocurrir, incluido la fibrosis biliar (centrada en los conductos biliares de las tríadas portales), la fibrosis hepática focal o multifocal (extendida aleatoriamente por todo el parénquima) o la fibrosis hepática difusa (afecta todas las regiones del lóbulo y está presente en todo el hígado). La fibrosis difusa con formación de nódulos hiperplásicos, es por definición la cirrosis (McGavin y Zachary, 2009; Maclachlan y Cullen, 1995).

Hay gran variedad de plantas que causan lesiones hepáticas en animales domésticos, hay dos tipos de fitotoxinas para ser discutidas. La primera de ellas son los alcaloides pirrolizidínicos, que precisan ser metabolizados a una forma activa en el hígado. El segundo tipo de toxinas es desdoblado por bacterias en el tracto gastrointestinal para liberar un factor que es subsecuentemente bioactivado en el hígado (McGavin y Zachary, 2009).

Los alcaloides pirrolizidínicos son encontrados en muchas familias de plantas, inclusive Compositae, Leguminosae y Boraginaceae. Los géneros más importantes son *Senecio*, *Cynoglossum*, *Amsinckia*, *Crotalaria*, *Echium*, *Trichodesma* y *Heliotropium*. Aproximadamente se reconocen cien tipos de alcaloides, el efecto tóxico depende del tipo que esté presente en las plantas ingeridas. Los alcaloides ingeridos son convertidos en ésteres pirrólicos por las enzimas hepáticas citocromo p-450. Esos ésteres son agentes alquilantes que reaccionan con los ácidos nucleicos, las proteínas nucleares y citosólicas. Los suinos son particularmente susceptibles a la intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos, los bovinos y equinos presentan una susceptibilidad media, y los ovinos en menor medida (McGavin y Zachary, 2009).

Las lesiones histológicas características de la intoxicación por los alcaloides son los megalocitos, que son hepatocitos con núcleo y volumen citoplasmático aumentado. Los megalocitos superan muchas veces el tamaño de los hepatocitos normales, siendo el resultado de los efectos antimitóticos de los alcaloides pirrolizidínicos; los que impiden la división celular pero no la síntesis de ADN, ya que los hepatocitos tienden a dividirse para reponer aquellos que están sufriendo necrosis. Esta alteración es un indicativo de intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos pero no es patognomónico, dado que esto ocurre con otras toxinas, como por ejemplo aflatoxinas (McGavin y Zachary, 2009).

De manera característica la intoxicación crónica por alcaloides pirrolizidínicos es acompañada por fibrosis hepática, proliferación biliar, en algunas circunstancias regeneración nodular del parénquima (McGavin y Zachary, 2009; Maclachlan y Cullen, 1995).

Las aflatoxinas son producidas por algunos hongos como *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Las aflatoxinas que más comunes son la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Estas son elaboradas durante el almacenamiento de alimentos contaminados por hongos, en condiciones de humedad y temperatura, pueden estar presentes en cosechas de maíz, maní y semillas de algodón. Las aflatoxinas son biotransformadas, generalmente en compuestos menos tóxicos, pero con efectos carcinogénicos, tóxicos y teratogénicos, reflejan la conexión de los intermediarios tóxicos a proteínas, ADN o ARN celulares (McGavin y Zachary, 2009).

Los suinos, caninos, equinos y bovinos, especialmente los animales jóvenes, son sensibles a los efectos tóxicos de las aflatoxinas (McGavin y Zachary, 2009). Los ovinos, los bovinos adultos y las ratas son bastante resistentes, mientras que perros, cerdos, ratones y patos son sensibles y pueden presentar una intoxicación fatal a dosis menores a 1,0 mg/kg de peso vivo (Stalker y Hayes, 2007).

Las intoxicaciones crónicas son más comunes que las agudas, y pueden producir problemas de crecimiento, mayor susceptibilidad a infecciones, y en ocasiones dan como resultado insuficiencia hepática. Los hígados afectados son firmes y pálidos, y microscópicamente se caracterizan por una lipidosis y necrosis de los hepatocitos, hiperplasia biliar, fibrosis centro lobular a fibrosis en puente, y atipia celular de los hepatocitos, caracterizada por tamaño variable de la célula y de los hepatocitos (McGavin y Zachary, 2009).

## 2.8. Características principales de *Echium plantagineum*

Familia: Boraginaceae

Nombre científico: *Echium plantagineum*

Nombre común: "Flor morada"



Figura 1: *Echium plantagineum* en estado de floración en Estación experimental "Dr. Mario A. Cassinoni".



Figura 2: *Echium plantagineum* en estado vegetativo en Estación experimental "Dr. Mario A. Cassinoni".

Esta planta herbácea de la familia Borragineaceae conocida con el nombre de "Flor morada", es una planta de ciclo anual que germina a inicios de otoño y florece en primavera (Fig. 1), es invasora de pasturas y cultivos de invierno, observándose mayor cantidad en el primer año de implantación. Es palatable para animales principalmente cuando la planta es joven, en estado de brotación (Fig. 2). La intoxicación ha sido observada en bovinos en Brasil en áreas de

pasturas invadidas por *E. plantagineum* (Méndez, 1985). Una de las principales características de identificación de la planta es que crece con uno o varios tallos erectos alcanzando unos 30-80 cm de altura. Los tallos son ramificados, ásperos y con pelos cortos, y sus hojas de igual característica. Las flores son de color azul violáceo (hasta púrpura) de hasta 2- 3 cm de largo (Cóppola y col., 2014).

Se considera que todas las partes de la planta son tóxicas, tanto verdes como secas. Su toxicidad es variable de una región a otra, también en una misma área en una misma época (Tokarnia y col., 2012). La concentración de alcaloides pirrolizidínicos depende de la época del año, el tipo de suelo, fertilidad y otros factores ambientales, siendo posible la intoxicación dependiendo de la cantidad ingerida y de la susceptibilidad de los animales (Cóppola y col., 2014).

La toxicidad de la planta está dada por la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, echiumina y echimidina, causando una lesión hepática progresiva, pudiendo observarse signos clínicos y muerte de los animales durante períodos de tiempo prolongados y varios meses después de la ingesta de la planta. Su morbilidad varía de 1% a 30% y la letalidad es prácticamente de un 100% (Riet-Correa y col., 2007). Si bien se reporta la toxicidad de ésta planta, Culvenor y col. (1984) en ovinos, no encontraron lesiones cuando la planta fue administrada a razón de 0,11-0,15 y 0,032-0,047% de la dieta, respectivamente. Resultados similares fueron reportados cuando se alimentaron terneros con una dosis total de 81,4 mg/kg de peso corporal y ovinos que recibieron una dosis total de 105,6 mg/kg de peso corporal. Si bien las ovejas no mostraron toxicidad, los terneros desarrollaron hepatopatía (Craig et al., 1986, citado por Wiedenfeld y Edgar, 2011).

## **2.9. Alcaloides pirrolizidínicos en los rumiantes**

Los alcaloides pirrolizidínicos (AP) no son hepatotóxicos, carcinogénicos, genotóxicos, teratogénicos y neumotóxicos (IPCS, 1988) por sí mismos, sino que se convierten, por la citocromoP450 monooxigenasa localizadas en hepatocitos en 6,7 dihidropirrolizina con tales propiedades tóxicas. (Wiedenfeld y Edgar, 2011).

Para los rumiantes, la actividad de los microorganismos del rumen que destruyen los AP los hace más resistentes que las especies monogástricas a la intoxicación. Estas consideraciones proporcionan una explicación del hecho de que la toxicidad de los AP es diferente, en diferentes especies e individuos. Por ejemplo, mientras que los caballos son muy sensibles a la intoxicación, las ovejas, las cabras y el bovino son mucho más resistentes y toleran dosis de AP mucho más altas.

Otro aspecto importante de la intoxicación por AP en rumiantes es que los mismos tienen baja susceptibilidad a la intoxicación y rara vez muestran intoxicación aguda, en general, progresan los efectos tóxicos sub-agudos a crónicos.

Se ha demostrado además que los AP no se destruyen durante la producción de heno y que estos productos retienen la toxicidad durante un período muy largo. También se ha demostrado que en los ensilajes se presenta una reducción (de hasta 20%) en la toxicidad de los AP (Wiedenfeld y Edgar., 2011).

## **2.10. Antecedentes regionales y en el país de intoxicación por *Echium plantagineum***

Culvenor y col. (1984) demostraron en Australia la susceptibilidad variable a la intoxicación por la ingesta de *Echium plantagineum* en rumiantes y monogástricos mediante la experimentación con ratas y ovejas, demostrando que estas últimas son más resistentes.

En el periodo transcurrido entre 1978-1982 en Pelotas, Rio grande do Sul, Brasil, Riet-Correa y col. (1983) constataron los siguientes antecedentes de intoxicación por Flor morada. De un lote de 77 terneros, murieron 28 animales. Estos animales pastoreaban en verdeos contaminados con la planta y eran suplementados con heno y ración comercial. En el ganado restante aparecen 3 casos de fotosensibilización de 125 vacas. En el año 1980, en el mismo predio, se había observado 3 casos de fotosensibilización en 44 terneras y el año anterior 1 caso en vaquillonas. En otro brote reportado por los mismos autores, en un rodeo lechero de 80 animales que pastoreaban avena con Rye grass donde crecía abundante *E. plantagineum*, murieron 3 vacas. Además, Méndez y col. (1985), realizaron tres experimentos. En el primer experimento se alimentó pollos de tres semanas de vida, con 2,5-5% de Flor morada en floración, durante 50 días. Posteriormente, se les realizó la necropsia, encontrándose el hígado amarillo y aumentado de tamaño, edema subcutáneo y en cavidad torácica abdominal. Histológicamente había megalocitosis y proliferación de canalículos biliares, correspondiendo los grupos que consumieron mayor porcentaje de planta a las alteraciones más marcadas. En un segundo experimento se colectó planta en fase de floración suministrándoselas a dos terneros al 10% de la ración durante 80 días. Uno de los terneros (consumo 220g/kg PV) muere a los 167 días de haber terminado el consumo, mientras que el restante sobrevivió (consumió 270g/kg PV). Y un tercer y último experimento, la planta fue recolectada en fase de crecimiento y mezclada al 10% de la ración. Uno de los animales consumió 240 g/kg PV durante un periodo de 66 días, el otro consumió 320g/kg PV durante 69 días, muriendo a los 187 días de haber finalizado el consumo. En las necropsias se observó hígado disminuido de tamaño y color claro. Histológicamente reveló lesión de fibrosis, megalocitosis y proliferación de los canalículos biliares.

En Uruguay, se reportan antecedentes en el año 1975. Según Riet-Alvariza y col. (1977), en el año 1975 en la Colonia Piamontesa, en el departamento de Colonia, en un grupo de 19 animales de la raza Holando, 14 bovinos enfermaron, muriendo uno de ellos. Estos animales permanecieron de 2 a 3 meses en una pradera de alfalfa, en la cual había predominio de *E. plantagineum* que manifestaba evidencia de haber sido consumida por los animales afectados.

En el año 2015 en el Departamento de Río Negro, en el mes de agosto, se registró una sospecha de intoxicación por *E. plantagineum* que fue comunicada por el Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE, Paysandú (R. Rivero Com. Personal). El brote en cuestión ocurrió en un predio lechero, donde se produjo la muerte de terneros en la fase de la recría (de entre 4 a 5 meses de edad) con signos clínicos de ataxia, incoordinación motora, opistótonos y tenesmo. En las necropsias realizadas los principales hallazgos macroscópicos fueron edema en músculos abdominales, mesenterio y múltiples petequias, linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño, ascitis (el líquido tenía una coloración icterico - hemorrágico), riñones pálidos, hígado aumentado de tamaño, icterico, con bordes irregulares y puntillado, vesícula biliar aumentada de tamaño, hiperqueratosis de la mucosa ruminal, abomaso edematoso y con úlceras crónicas y agudas, pulmón izquierdo tenía afectados los lóbulos caudal, medio y accesorio con zonas hemorrágicas y consolidadas, por último, las meninges se encontraban con congestión generalizada. Había además ictericia generalizada leve. En las muestras remitidas al laboratorio para análisis histopatológico se destacaron principalmente severa fibrosis hepática difusa, proliferación canalicular con megalocitosis, así como degeneración vacuolar de la sustancia blanca del sistema nervioso central. Las lesiones halladas a nivel de hígado (fibrosis, proliferación de canaliculos hepáticos con megalocitosis) eran compatibles con un cuadro de intoxicación por AP. En la visita al predio, se constató la presencia de *E. plantagineum* en una pastura de avena que había sido consumida. De la anamnesis también se destaca que los animales consumieron heno de pradera de *Lotus corniculatus*, que según los encargados, también estaba invadida por *E. plantagineum* al momento de la cosecha. En base a estos datos se estableció la sospecha de un brote de intoxicación por esta planta.

### **2.11. Diagnóstico de la intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos**

Para el diagnóstico de la intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos, se toman en cuenta los datos epidemiológicos, síntomas clínicos, funcional hepático, datos de necropsia y diagnóstico histopatológico. Algunos de los síntomas que presenta el cuadro de intoxicación por la planta se asocian al mal estado en general, tenesmo, inapetencia, prolapso rectal y diarrea fétida. A éstos se le suman los síntomas nerviosos asociados a la hipersensibilidad, temblores, incoordinación, dificultad para desplazarse y agresividad. También se puede observar el aumento de frecuencia cardíaca (taquicardia), lesiones ulceradas en lengua, producción excesiva saliva (sialorrea), ictericia (color amarillento en las mucosas), inflamación de la membrana que cubre el interior de los párpados (conjuntivitis), inflamación en la córnea (queratitis), y lesiones de fotosensibilización asociadas a pérdida de piel, alopecia y resecamiento. También se observa edema de miembros y ubre (Coppola y César, 2014).

Para el diagnóstico de la intoxicación por AP se ha utilizado la biopsia hepática y la histología del hígado, para la detección de las lesiones características. En el hígado se identifican el tamaño de celular de los hepatocitos, uniformidad celular, fibrosis portal, proliferación de ductos biliares y reacción inflamatoria (Seaman y col. 1989; Peterson y Jago, 1984). También se pueden utilizar el estudio de niveles séricos de enzimas como la aspartato aminotransferasa

(AST) y la gamaglutamil transpeptidasa (GGT) para la detección de la lesión hepática.

Entre los principales hallazgos macroscópicos “puede observarse hígado de color amarillo-ocre con aumento de la consistencia, aumento del tamaño de la vesícula biliar con edema de pared, edema generalizado en peritoneo, intestino delgado, grueso y abomaso, y presencia de líquido en cavidad abdominal, torácica y pericárdica” (Cóppola y César., 2014).

### **3. HIPÓTESIS**

La planta *Echium plantagineum* es tóxica para bovinos, produciendo un cuadro de insuficiencia hepática crónica.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo General:**

Determinar si *Echium plantagineum* es tóxica a determinadas dosis en bovinos, mediante la reproducción experimental en ésta especie, así como conocer las características, tipo y concentración de AP encontrados en la planta.

#### **4.2. Objetivos específicos:**

- Realizar la reproducción experimental de la intoxicación *Echium plantagineum* en bovinos, administrando por vía oral la planta seca, registrando los parámetros clínicos, metabólicos y patológicos en los animales del experimento.
- Determinar la concentración y tipos de AP en la planta obtenida en el predio problema y utilizada en la reproducción experimental.
- Determinar las alteraciones histológicas hepáticas durante el ensayo, inducidas por la planta, mediante biopsias de los animales intoxicados experimentalmente.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, ubicada en el km 363,500 de la Ruta N°3, en el departamento de Paysandú, Uruguay, Sede Paysandú de Facultad de Veterinaria. El trabajo experimental tuvo la aprobación de la Comisión de Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (CEUAFVET-609).

Se utilizaron seis terneros, machos castrados, de raza Holando, de entre 6 y 8 meses de edad, pertenecientes a la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC) de la Facultad de Agronomía. Sesenta días previos al comienzo de los experimentos fueron dosificados con un antiparasitario de amplio espectro (Fosfato de Levamisol a la dosis 8 mg por kg de peso) y se comenzó a suplementar con 2 kg/animal/día de ración con 16% de proteína cruda (Nombre comercial “Terneros 1”, Cooperativa COPAGRAN) en comederos colectivos. Se llevó un registro semanal de peso vivo de los animales. El control parasitario de los animales se realizó cada 21 días, mediante el recuento de huevos por gramo de materia fecal, utilizando la técnica de McMaster.

Para la realización del trabajo se seleccionó un potrero de campo natural mejorado libre de plantas tóxicas conocidas, con sombra y agua ad libitum. En dicho potrero se realizaron parcelas en las cuales se mantuvieron los distintos animales durante todo el periodo experimental.

### 5.1. Procesamiento de *Echium plantagineum*

Se utilizó planta que fue recolectada en el año 2015, en un establecimiento del Departamento de Río Negro, donde se registró un foco con casos colectivos de fibrosis hepática. De la planta que se encontraba en estado vegetativo, se extrajeron las hojas y las mismas fueron secadas a temperatura ambiente durante 72 horas. Posteriormente se secó durante 48 hs en estufa a 60°C para luego ser triturada en un molino de forraje “Wiley Mill”, modelo standard N°3 (Fig. 4).

Por otra parte, se colectó *E. plantagineum* en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” en setiembre del año 2017, realizando el mismo procedimiento de secado y molido de la planta anteriormente mencionado.





Figura 3. Hojas y tallos de *Echium plantagineum* a temperatura ambiente para el secado inicial.



Figura 4. Molino de forraje “Wiley Mill”, modelo standard N°3. Plantas siendo procesadas en molino de forraje.

## 5.2. Experimentos realizados

### 5.2.1. Experimento N°1

En el experimento N°1 se utilizó planta que fue obtenida del predio con sospecha de intoxicación por *E. plantagineum* en bovinos y planta obtenida en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC). Se realizaron dos

tratamientos presentados en la Tabla 1. Se utilizaron dos terneros por tratamiento, que fueron distribuidos al azar en cada grupo.

Tabla 1. Tratamientos del experimento N° 1.

Tratamiento	
Tratamiento A	<i>Echium plantagineum</i> seca y molida
Tratamiento control	Control Negativo, sin administración de <i>Echium plantagineum</i>

El peso promedio de los animales al inicio del experimento fue de 190±12 kg de peso vivo para el Tratamiento A y 191±9 kg de peso vivo para el Tratamiento control.

La administración de la planta seca y molida del Experimento N° 1 se detalla en la Tabla 2. El día de inicio del experimento se administró 200g de planta por animal, retomando el día 28 el suministro con 500g por animal.

Para facilitar la administración de la planta, se mezclaba la dosis por animal con 2 litros de agua, y la mezcla era administrada por sonda bucoesofágica. Los días de administración de la planta, los terneros fueron traídos a las instalaciones para suministrarle la dosis correspondiente, para luego ser llevados a sus parcelas de origen.

Tabla 2. Administración de *Echium plantagineum* a los animales del Tratamiento A, en el experimento N°1

Día	g/día/animal	Origen de la planta
0	200	Predio problema
28	500	EEMAC
29	500	EEMAC
30	500	EEMAC
31	500	EEMAC
32	500	EEMAC
Dosis total de planta seca/kg peso vivo*	14,0g/kg de peso vivo	

\*La dosis total fue estimada tomando como referencia el peso inicial de los animales tratados.

Los animales del tratamiento A, recibieron 1,0g/kg de peso vivo de la planta problema (del predio comercial) y 13g/kg de peso vivo de la planta recolectada en la EEMAC. Los terneros del tratamiento control no recibieron la planta. Los terneros de ambos tratamientos fueron suplementados todos los días con 2 kg de ración comercial por animal hasta el día 80 de experimento, permaneciendo en un campo natural mejorado. Desde el día 80 al día 91, pasaron a comer 1kg de ración comercial por animal y por día. Desde el día 92 hasta el día 165 permanecieron sin suplementación en el campo natural mejorado.

### 5.2.2. Experimento N° 2

En el experimento N°2 se utilizó *E. plantagineum* recolectada en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC). Se realizaron dos tratamientos presentados en la Tabla 3. Se utilizaron dos terneros por tratamiento, que fueron distribuidos al azar en cada grupo.

Tabla 3. Tratamientos del experimento N°2

Tratamiento	
Tratamiento B	<i>Echium plantagineum</i> seca y molida
Tratamiento control	Control Negativo, sin administración de <i>Echium plantagineum</i>

El peso promedio de los animales al inicio del experimento fue de 162±17 kg de peso vivo para el Tratamiento B y 216±16 kg de peso vivo para el Tratamiento control.

La planta seca y molida, fue suministrada de acuerdo a lo presentado en la Tabla 4. En el día 0 y 1 se administraron 200g por animal, suspendiendo hasta el día 7, dónde se reanuda la administración con una dosis de 100g/animal/día.

Tabla 4. Administración de *Echium plantagineum* a los animales del Tratamiento B, en el experimento N°2

Día	g/día/animal
0	200
1	200
7 al 31	100
Dosis total de planta seca/kg peso vivo*	14,3g/kg de peso vivo

\*La dosis total fue estimada tomando como referencia el peso inicial de los animales tratados.

La dosis de planta fue ofrecida en comederos individuales a cada animal del tratamiento B, mezclándola con la ración comercial que se administró diariamente. Se controlaba en cada oportunidad que los animales consumieran la totalidad de la mezcla.

Todos los terneros, del tratamiento control y tratamiento B, fueron suplementados diariamente con 2 kg de ración comercial por animal hasta el día 52 del experimento y permanecieron en el campo natural mejorado. Desde el día 52 al día 63 pasaron a comer 1kg de ración comercial por animal y por día. Desde el día 64 hasta el día 137 permanecieron sin suplementación en el campo natural mejorado.

### **5.3. Determinaciones en los animales**

En ambos experimentos se realizó el examen clínico individual de cada animal. Se determinó la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, frecuencia ruminal, temperatura rectal, coloración de mucosas, prueba de la cruz, prueba de la yugular, pliegue cutáneo, palpación de ganglios linfáticos, dos veces por semana (lunes y jueves) desde el día 0 hasta el día 91 en el Exp. N°1 y hasta el día 63 en el Exp. N°2 luego de la administración de la planta. Luego de realizado el examen clínico se realizó la medición de peso vivo de los animales.

También se realizó extracción de sangre de la vena coccígea, utilizando tubos sin anticoagulante. La sangre fue centrifugada a 3000 r/min y el suero se congeló a -20°C hasta posterior análisis. En el experimento N°1, la extracción de sangre se realizó, dos veces por semana, hasta el día 30 y luego una vez semana hasta el día 91. En el experimento N°2 se extrajo sangre una vez por semana. Además, en los animales del experimento N°1 se realizó la extracción de sangre los días 123 y 165 del experimento y en el Exp. N°2 los días 95 y 137.

En el suero sanguíneo se determinó la concentración de las enzimas hepáticas Gama glutamil transferasa (GGT), Aspartato amino transferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), Fosfatasa alcalina (FAS), urea, creatinina, albúmina y proteínas totales. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de Paysandú (Facultad de Veterinaria, Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni"). Se utilizaron los kits comerciales del Laboratorio Wiener Lab, utilizando los controles comerciales del mismo laboratorio. El coeficiente de variación inter e intraensayo para todas las determinaciones fue menor a 10%.

### **5.4. Biopsia hepática**

En los dos experimentos se realizaron biopsias hepáticas de todos los animales. En los animales del Experimento N°1 las biopsias fueron realizadas los días 0, 28, 60, 91 y 164, mientras que en los animales del Experimento N°2 fueron realizadas los días 0, 32, 63 y 136.

Se realizó primeramente la preparación de la zona a puncionar (tricotomía, lavado, asepsia, anestesia local de piel y músculo intercostal), localizada en 11° espacio intercostal en la intersección con la línea trazada desde la tuberosidad iliaca y la articulación escapulo humeral, según lo descrito por Adrien (2014). Las muestras de hígado fueron colocadas en tubos con formol bufferado al 10% y enviadas al Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE, Paysandú, para la realización de estudio histopatológico, siendo teñidos los cortes con Hematoxilina-Eosina.

### **5.5. Identificación y cuantificación de los AP de *Echium plantagineum***

De la planta utilizada en los dos experimentos, se remitió muestras al Laboratorio “Poisonous Plant Research Laboratory”, Utah, perteneciente al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), con el fin de tipificar y cuantificar AP. La metodología para estas determinaciones está reportada por Gardner y col. (2006). Se remitieron 5 muestras de la mezcla de la planta seca y molida. Tres muestras correspondieron a la planta colectada en el predio dónde ocurrió la sospecha de la intoxicación y otras dos muestras de la planta colectada en la EEMAC y utilizada en ensayos.

### **5.6. Análisis estadístico**

Todas las variables repetidas en el tiempo (frecuencia cardíaca, respiratoria, ruminal, enzimas hepáticas, urea, creatinina, albúmina, proteína total) fueron analizadas con un modelo mixto en el SAS (Statistical Analysis Software, SAS versión 9.2, 2008). En el modelo se incluyeron como efectos fijos el tratamiento y los días de experimento, así como la interacción entre los mismos. Se consideró diferencia significativa cuando el valor de probabilidad fue de  $p < 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Experimento N°1**

#### **6.1.1. Parámetros clínicos y peso vivo**

En la Fig. 5 se presenta la frecuencia respiratoria para los dos tratamientos. No hubo efecto de los tratamientos ( $p=0,09$ ) sobre este parámetro, sin embargo, la frecuencia respiratoria estuvo afectado por los días de experimento ( $p=0,003$ ). La interacción entre tratamiento y días de experimento no fue significativa ( $p=0,96$ ).

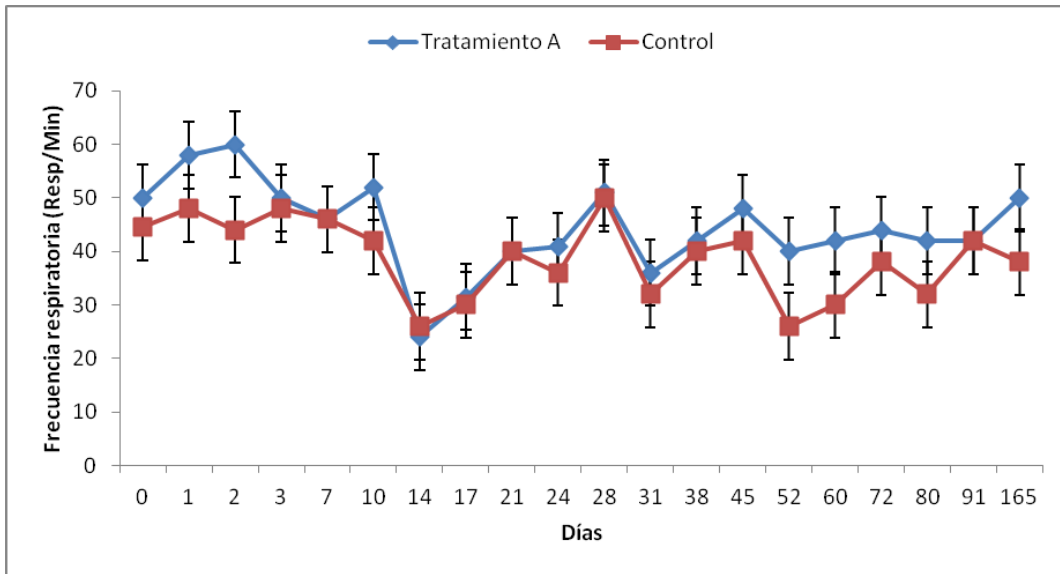


Figura 5. Frecuencia respiratoria en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 6 se presenta la frecuencia cardiaca para los dos tratamientos. No hubo efecto de los tratamientos ( $p=0,37$ ), días de experimento ( $p=0,38$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,96$ ).

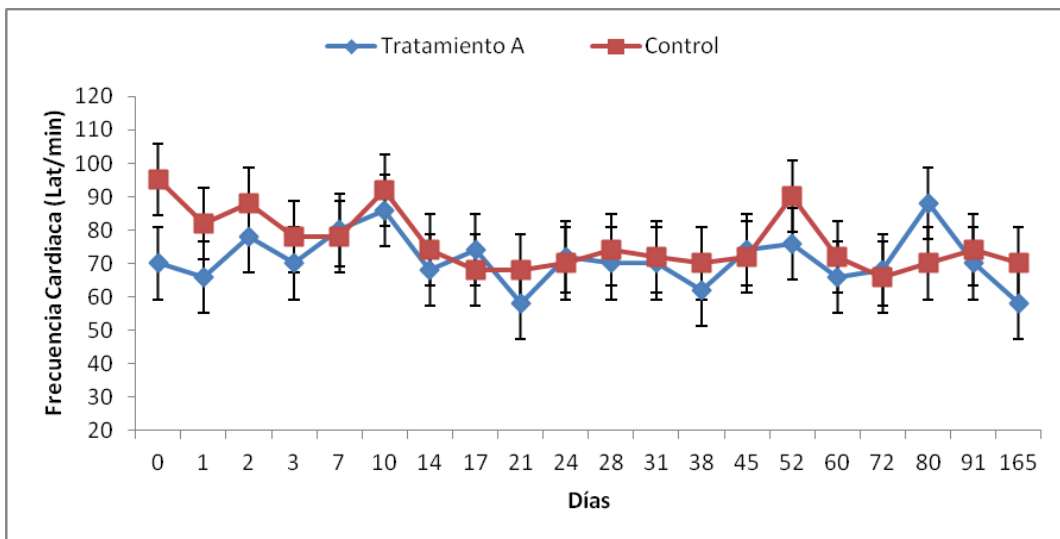


Figura 6. Frecuencia cardiaca en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 7 se presenta la temperatura rectal para los dos tratamientos. No hubo efecto de los tratamientos ( $p=0,07$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,07$ ). La temperatura rectal estuvo afectada por los días de experimento ( $p<0,0001$ ).

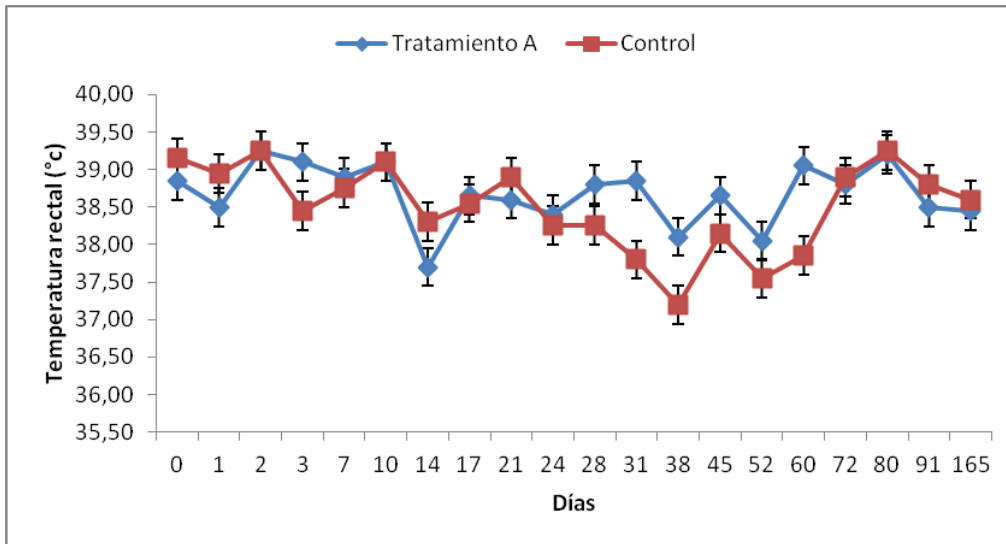


Figura 7. Temperatura rectal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 8 se presenta la frecuencia ruminal para los dos tratamientos en relación a los días de experimento. Los tratamientos no afectaron la frecuencia ruminal de los animales ( $p=0,15$ ). Hubo efecto de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,02$ ) y de los días de experimento ( $p=0,0015$ ).

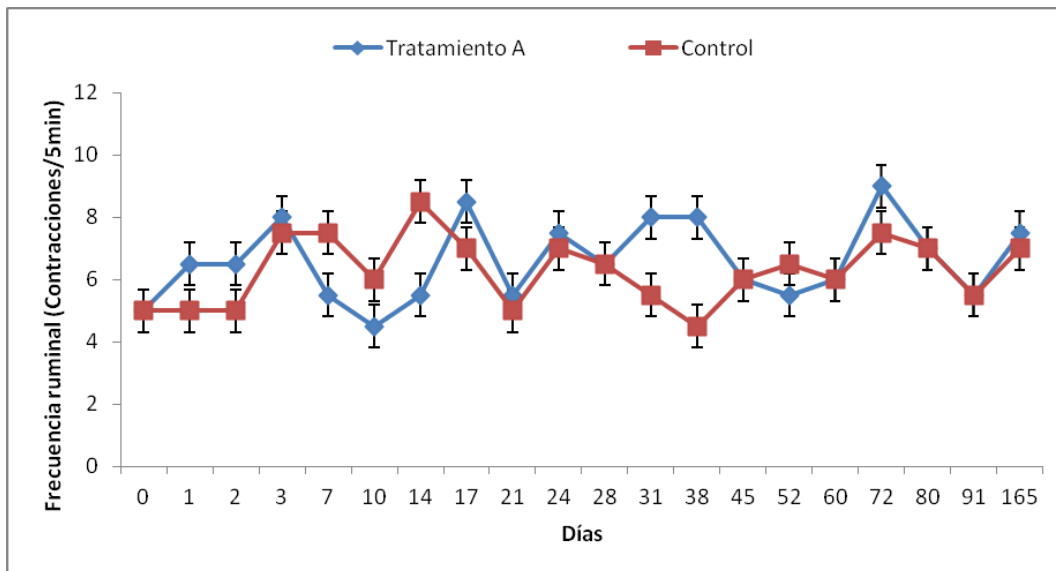


Figura 8. Frecuencia ruminal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 9 se presenta el peso para los animales de los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron el peso vivo de los animales ( $p=0,79$ ), pero estuvo

afectado por los días de experimento ( $p < 0,0001$ ) y por la interacción entre días de experimento y los tratamientos ( $p = 0,02$ ).

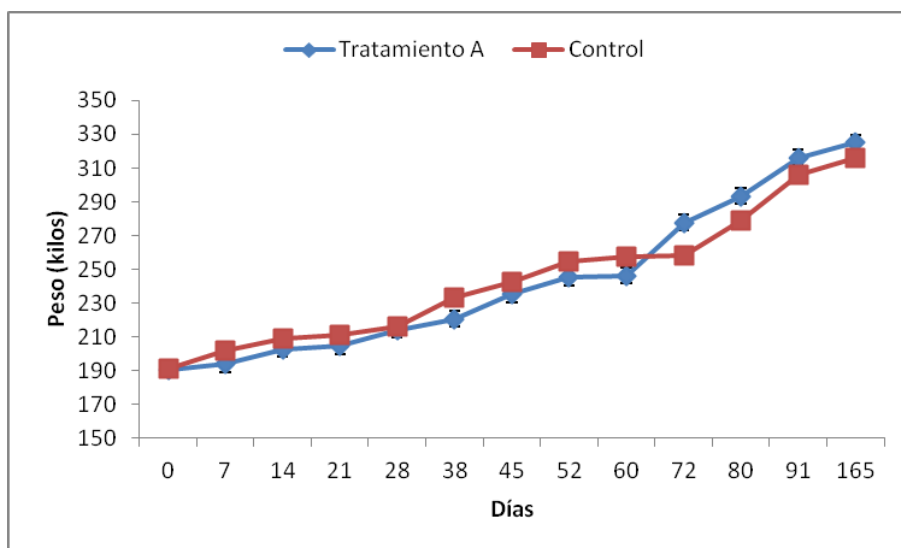


Figura 9. Peso vivo en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

#### 6.1.2. Enzimas hepáticas y metabolitos

En la Fig. 10 se presenta la concentración de proteína total (PT) para los dos tratamientos. Los tratamientos afectaron la concentración de proteína total ( $p < 0,0001$ ) pero no hubo efecto de los días de experimento ( $p = 0,86$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p = 0,40$ ). La concentración de PT fue mayor en el Tratamiento control ( $67,9 \pm 0,7$  g/L) con relación al Tratamiento A ( $62,5 \pm 0,7$  g/L).

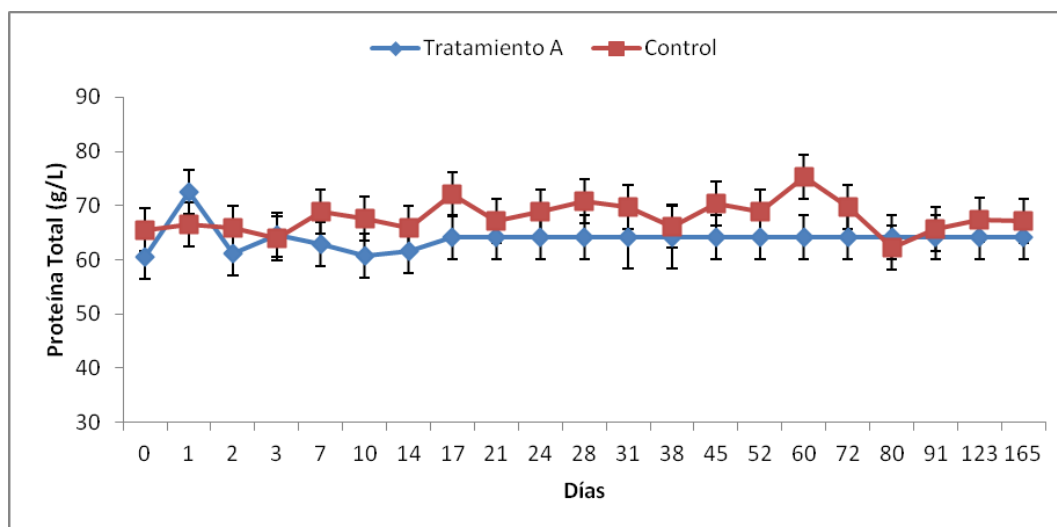


Figura 10. Concentración de proteína total en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).



En la Fig. 11 se presenta la concentración de albúmina sérica para los dos tratamientos. Los tratamientos afectaron la concentración de albúmina sérica ( $p=0,01$ ), pero no hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,09$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,13$ ). La concentración de albúmina fue mayor en el Tratamiento A ( $34\pm 0,4$  g/L) con relación al control negativo ( $33\pm 0,4$  g/L).

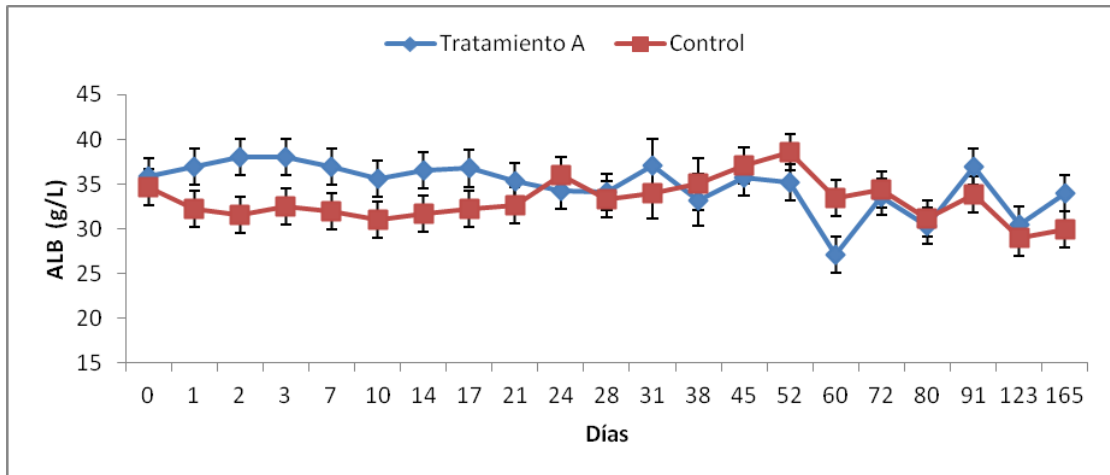


Figura 11. Concentración de albúmina sérica en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 12 se presenta la concentración de GGT para los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la concentración de ésta enzima ( $p=0,64$ ). Tampoco hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,51$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,99$ ).

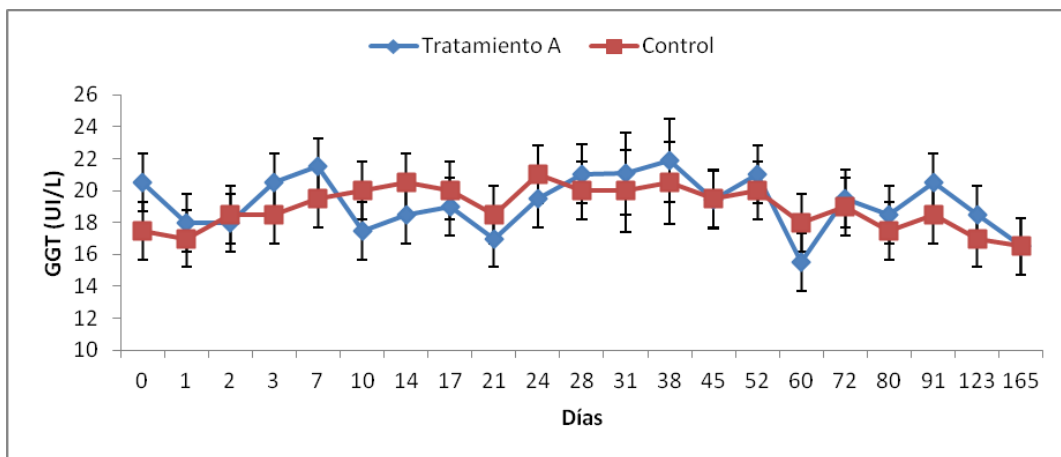


Figura 12. Concentración de Gamma glutamiltransferasa (GGT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 13 se presenta la concentración de AST para los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la concentración de AST ( $p=0,26$ ) y no hubo

efecto de los días de experimento ( $p=0,08$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,24$ ).

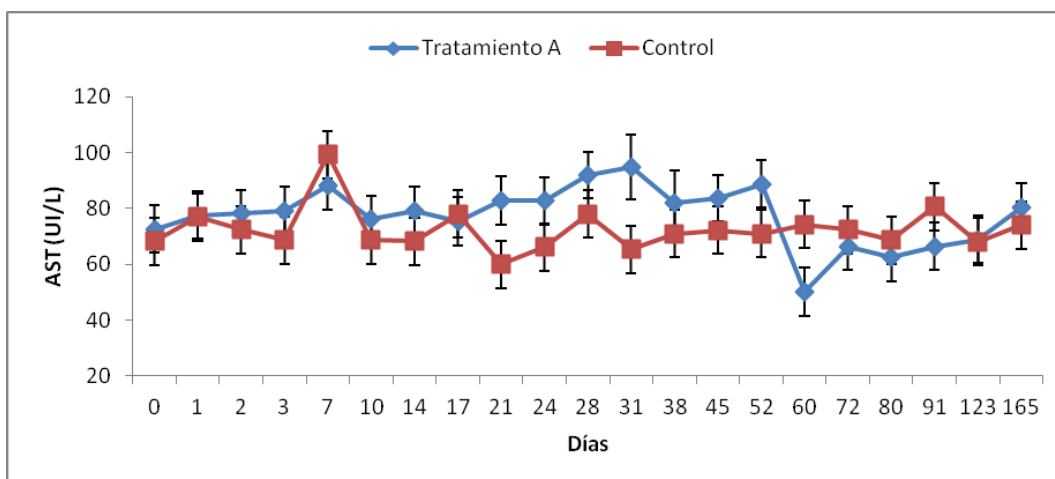


Figura 13. Concentración de Aspartato aminotransferasa (AST) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig.14 se presenta la concentración de Alanina aminotransferasa para los dos tratamientos. La concentración de esta enzima tampoco estuvo afectada por los tratamientos ( $p=0,44$ ), ni días de experimento ( $p=0,09$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,37$ ).

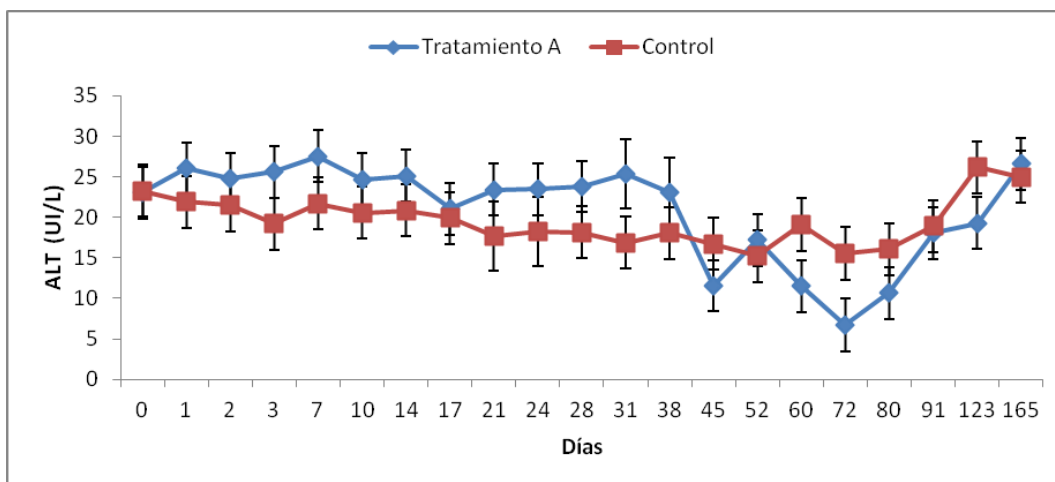


Figura 14. Concentración de Alanina aminotransferasa (ALT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 15 se presenta la concentración de FAS para los dos tratamientos. No hubo efecto de los tratamientos ( $p=0,25$ ), días de experimento ( $p=0,36$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,73$ ).

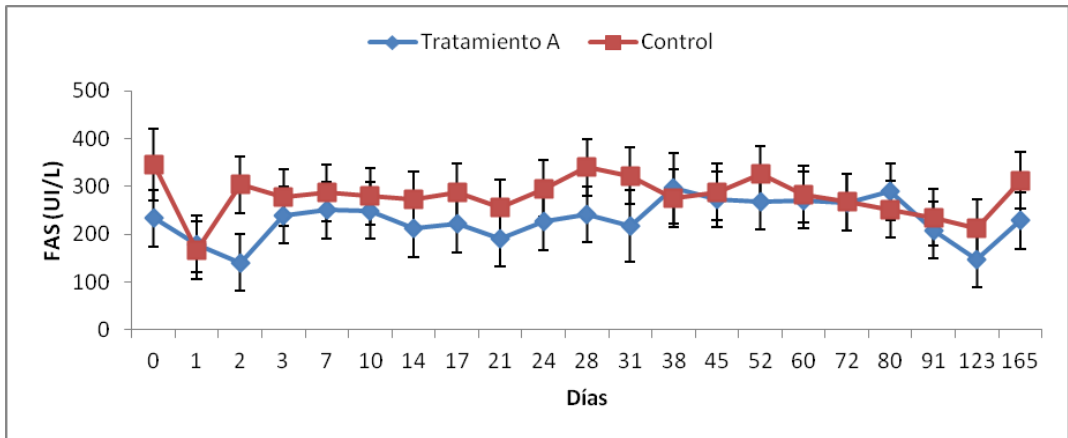


Figura 15. Concentración de fosfatasa alcalina en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

## 6.2. Experimento N°2

### 6.2.1. Parámetros clínicos y peso vivo

En la Fig. 16 se presenta la frecuencia respiratoria para los animales de los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la frecuencia respiratoria ( $p=0,24$ ), pero sin embargo hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,02$ ) y de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,04$ ).

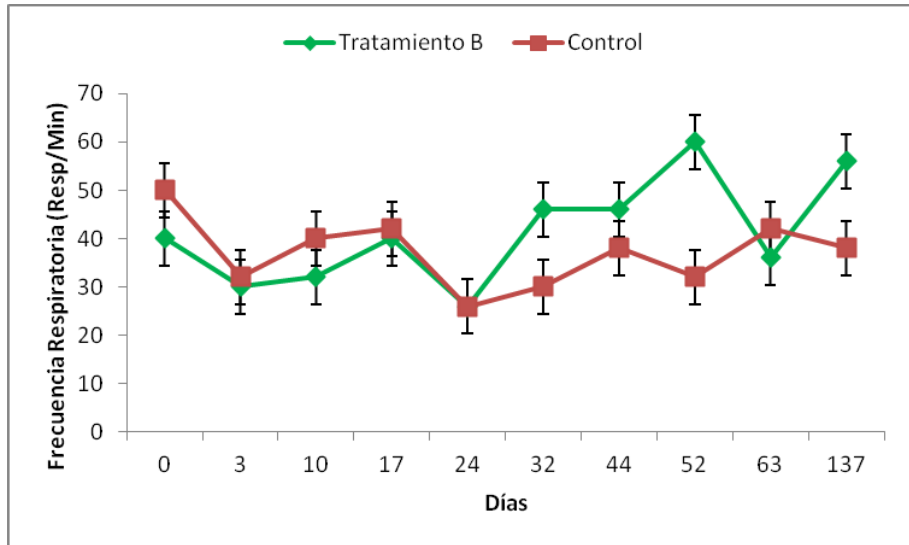


Figura 16. Frecuencia respiratoria en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 17 se presenta la frecuencia cardíaca para los animales de los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la frecuencia cardíaca ( $p=0,39$ ), ni tampoco los días de experimento ( $p=0,25$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,45$ ).

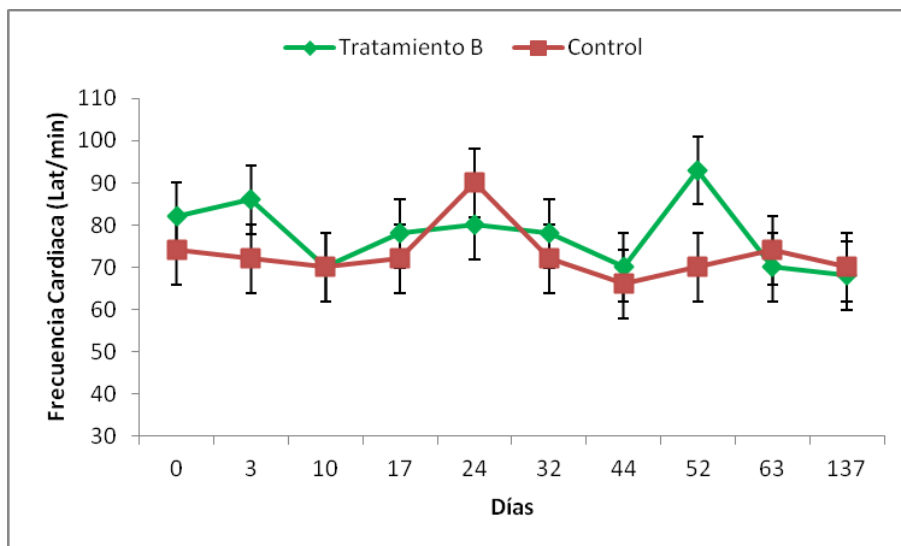


Figura 17. Frecuencia cardiaca en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 18 se presenta la temperatura rectal para los animales de los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la temperatura ( $p=0,17$ ), pero hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,002$ ). La interacción entre tratamiento y días de experimento no fue significativa ( $p=0,20$ ).

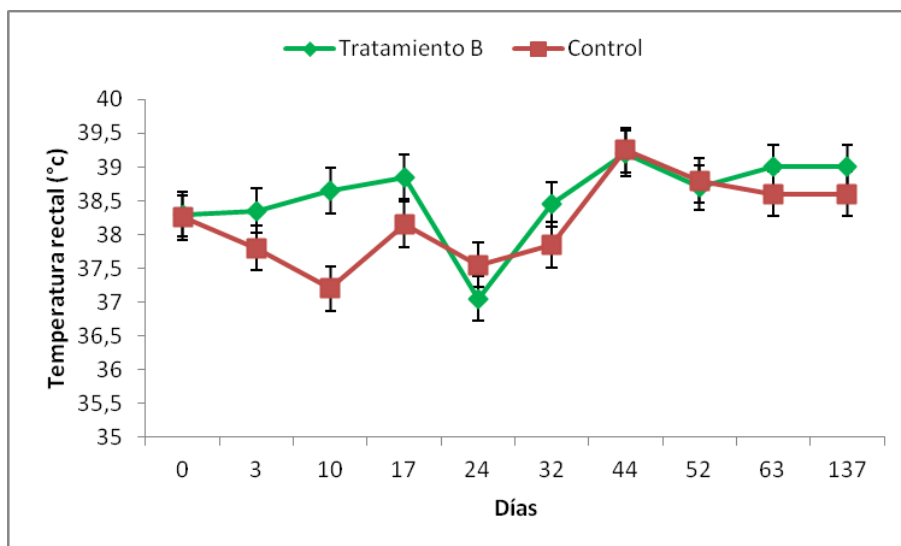


Figura 18. Temperatura rectal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 19 se presenta la frecuencia ruminal para los animales de los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la frecuencia ruminal ( $p=0,24$ ), ni tampoco los días de experimento ( $p=0,10$ ), ni hubo interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,73$ ).

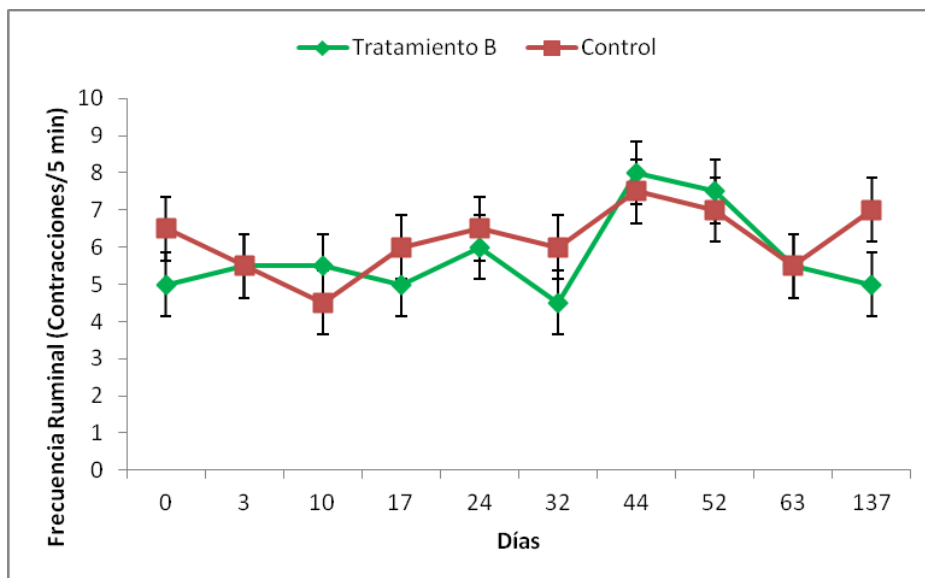


Figura 19. Frecuencia ruminal en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 20 se presenta el peso vivo de los animales en relación a los días del experimento. Los tratamientos no afectaron el peso vivo de los animales ( $p=0,28$ ). Hubo en cambio, efecto de los días de experimento ( $p<0,0001$ ). La interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,52$ ) no fue significativa.

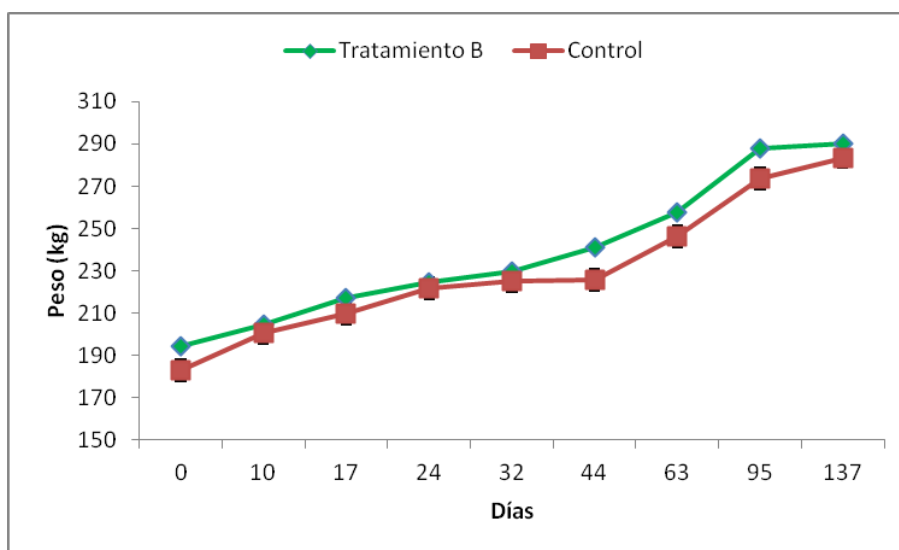


Figura 20. Peso en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

#### 6.2.2. Enzimas hepáticas y metabolitos

En la Fig. 21 se presenta la concentración de proteína total para los dos tratamientos. Los tratamientos afectaron la concentración de proteína total

( $p=0,0004$ ). En cambio, no hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,45$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,24$ ) sobre la concentración de proteína total. La concentración de PT fue mayor en el Tratamiento control ( $68,5\pm 0,9$  g/L) con relación al Tratamiento B ( $61,9\pm 0,9$  g/L).

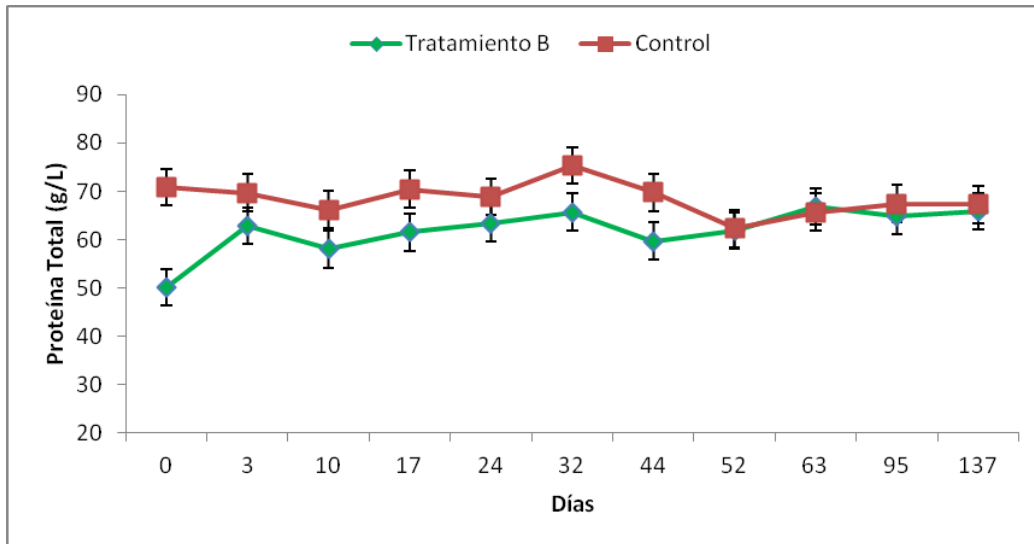


Figura 21. Concentración de proteína total en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 22 se presenta la concentración de la albúmina sérica para los animales de cada tratamiento en relación a los días del experimento. Los tratamientos no afectaron la concentración de la albúmina ( $p=0,14$ ). Tampoco hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,08$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,73$ ).

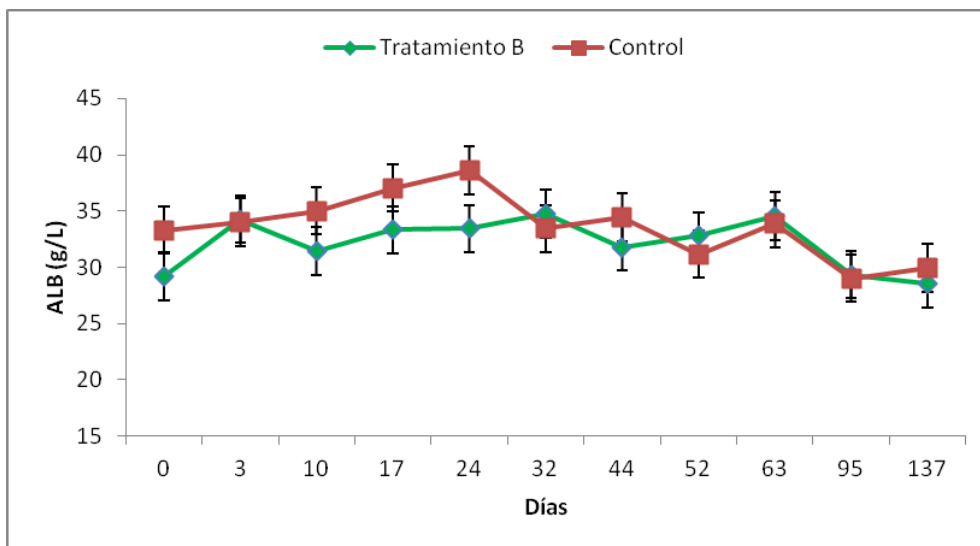


Figura 22. Concentración de Albúmina sérica (ALB) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 23 se presenta la concentración de gamma glutamil transpeptidasa para los dos tratamientos. Esta enzima no estuvo afectada por los tratamientos ( $p=0,21$ ), ni por los días de experimento ( $p=0,87$ ), ni por la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,95$ ).

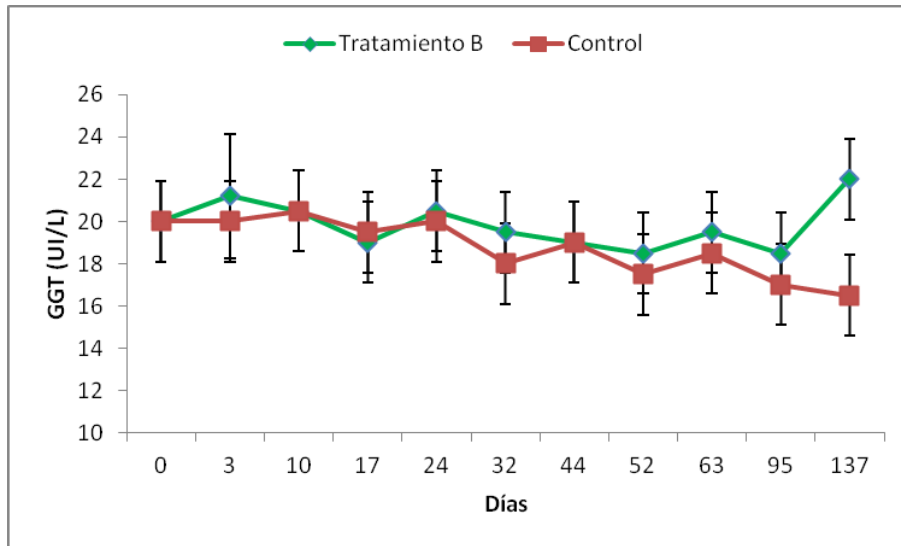


Figura 23. Concentración de Gamma glutamil transferasa (GGT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

En la Fig. 24 se presenta la concentración de aspartato aminotransferasa para los dos tratamientos. Los tratamientos no afectaron la concentración de GGT ( $p=0,25$ ). Además, no hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,69$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,60$ ).

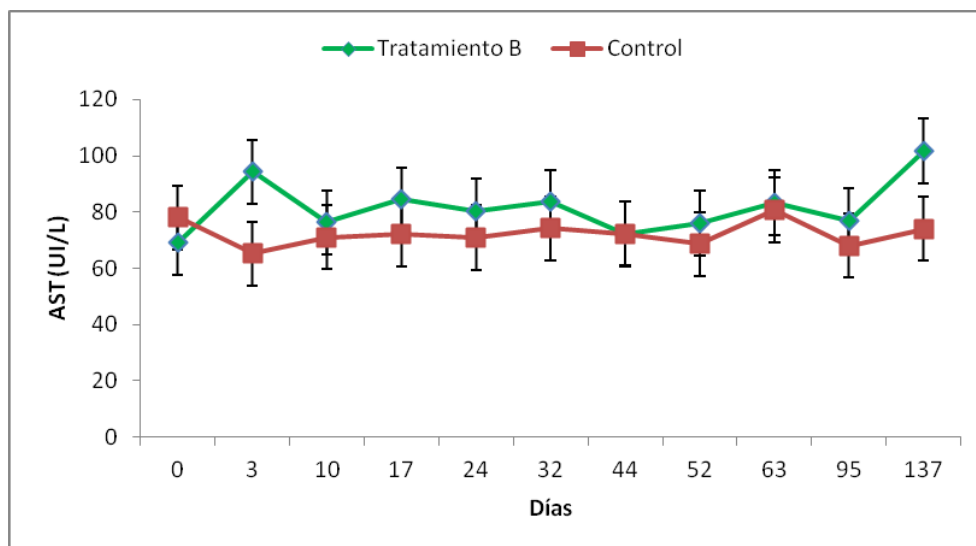


Figura 24. Concentración de Aspartato aminotransferasa (AST) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

Los tratamientos no afectaron la concentración de ALT ( $p=0,20$ ) y tampoco hubo efecto de los días de experimento ( $p=0,28$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,38$ ).

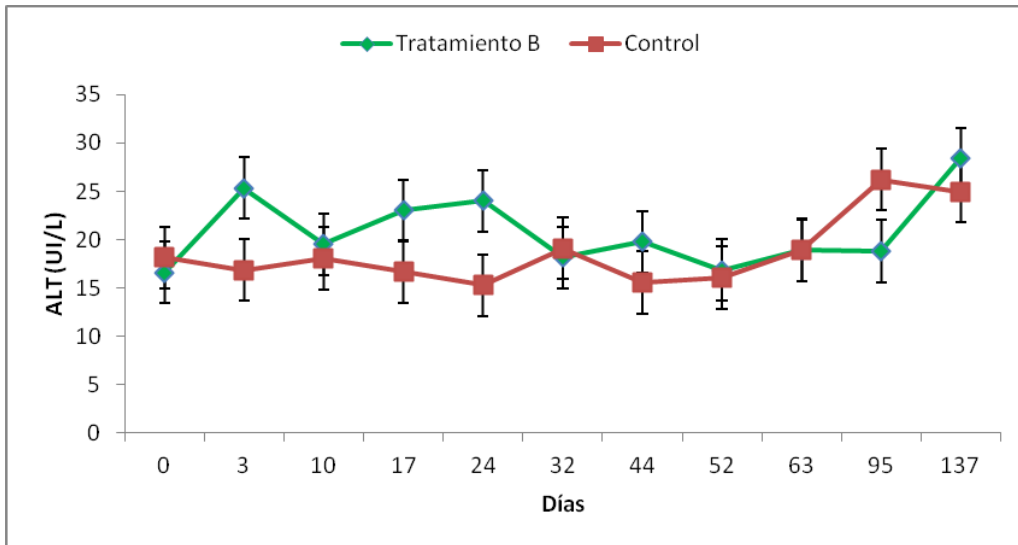


Figura 25. Concentración de Alanina aminotransferasa (ALT) en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).

La Fosfatasa alcalina fue otra enzima que no estuvo afectada por los tratamientos ( $p=0,80$ ) y tampoco estuvo afectada por los días de experimento ( $p=0,40$ ), ni de la interacción entre tratamiento y días de experimento ( $p=0,60$ ).

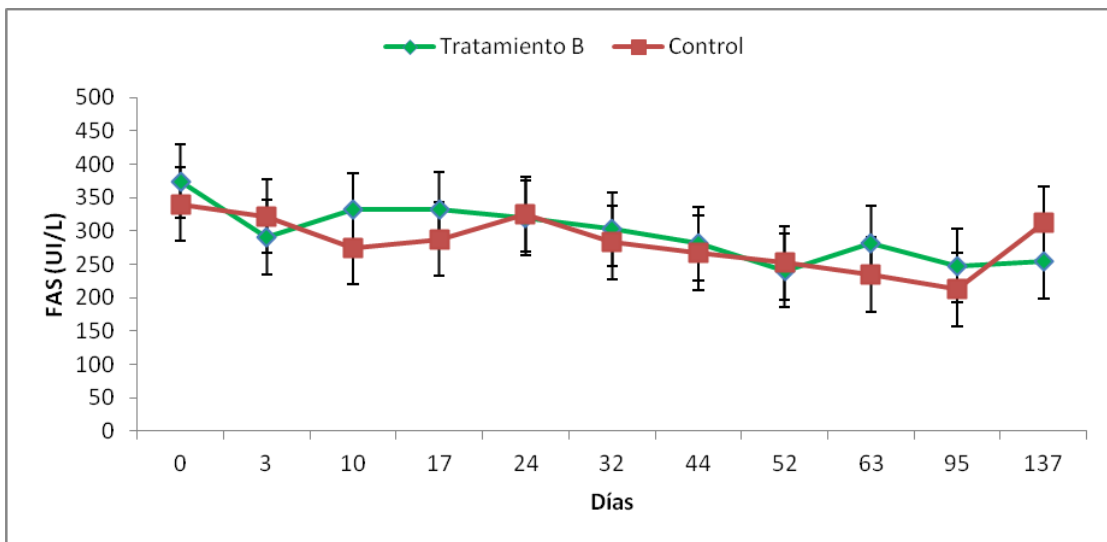


Figura 26. Concentración de Fosfatasa alcalina en relación a los días del experimento (Día 0= inicio experimento).



### **6.3. Biopsias hepáticas**

#### 6.3.1. Experimento N° 1

En la tabla 5 se presentan los resultados del estudio histológico de las biopsias de hígado extraídas de los terneros del experimento. No hubo alteración ni del tamaño ni de la uniformidad de los hepatocitos. Tampoco hubo proliferación de ductos ni fibrosis hepática. En algunas biopsias se evidenció grados leves de inflamación compuesta por linfocitos y plasmocitos (Fig. 27) y en otras el aumento del número de células de Kupffer.

Tabla 5. Experimento N°1: hallazgos histológicos en biopsias hepáticas de animales intoxicados con *Echium plantagineum* y animales controles negativos.

Días	Ternero	Tratamiento	Tamaño celular	Uniformidad celular	Fibrosis portal	Prolif. ductos biliares	Reacción inflamatoria
0	3613	A	-	-	-	-	+*1
28	3613	A	-	-	-	-	-
60	3613	A	-	-	-	-	+*2
91	3613	A	-	-	-	-	+*2
164	3613	A	-	-	-	-	-
0	3627	A	-	-	-	-	+*1
28	3627	A	-	-	-	-	-
60	3627	A	-	-	-	-	+*1
91	3627	A	-	-	-	-	+*2
164	3627	A	-	-	-	-	+*2
0	3614	Control	-	-	-	-	-
28	3614	Control	-	-	-	-	-
60	3614	Control	-	-	-	-	+*2
91	3614	Control	-	-	-	-	-
164	3614	Control	-	-	-	-	+*1
0	3623	Control	-	-	-	-	-
28	3623	Control	-	-	-	-	-
60	3623	Control	-	-	-	-	+*2
91	3623	Control	-	-	-	-	+*1
164	3623	Control	-	-	-	-	-

Clasificación: - =normal sin cambios, + =cambios leves, ++= cambios moderados, +++= severos cambios

\*1: Infiltrado linfoplasmocítico. \*2: Aumento de células de Kupffer.

### 6.3.2. Experimento N°2

En la tabla 6 se presentan los resultados del estudio histológico de las biopsias de hígado extraídas de los terneros del experimento N°2. Al igual que en el experimento 1, no hubo alteración ni del tamaño ni de la uniformidad de los hepatocitos. Además no hubo proliferación de ductos ni fibrosis hepática. Al igual que en los animales del Experimento N°1, en algunas biopsias se evidenció grados leves de inflamación compuesta por linfocitos y plasmocitos y en otras aumento del número de células de Kupffer (Fig. 28).

Tabla 6. Experimento N°2: hallazgos histológicos en biopsias hepáticas de animales intoxicados con *Echium plantagineum* y animales controles negativos.

Días	Ternero	Tratamiento	Tamaño celular	Uniformidad celular	Fibrosis portal	Prolif. ductos biliares	Reacción inflamatoria
0	3629	B	-	-	-	-	+*1
32	3629	B	-	-	-	-	+*2
63	3629	B	-	-	-	-	+*1
136	3629	B	-	-	-	-	-
0	3633	B	-	-	-	-	+*2
32	3633	B	-	-	-	-	+*1
63	3633	B	-	-	-	-	+*2
136	3633	B	-	-	-	-	-
0	3614	Control	-	-	-	-	-
32	3614	Control	-	-	-	-	+*2
63	3614	Control	-	-	-	-	-
136	3614	Control	-	-	-	-	+*1
0	3623	Control	-	-	-	-	-
32	3623	Control	-	-	-	-	+*2
63	3623	Control	-	-	-	-	+*1
136	3623	Control	-	-	-	-	0

Clasificación: - =normal sin cambios, + =cambios leves, ++= cambios moderados, +++= severos cambios

\*1: Infiltrado linfoplasmocítico. \*2: Aumento de células de Kupffer.

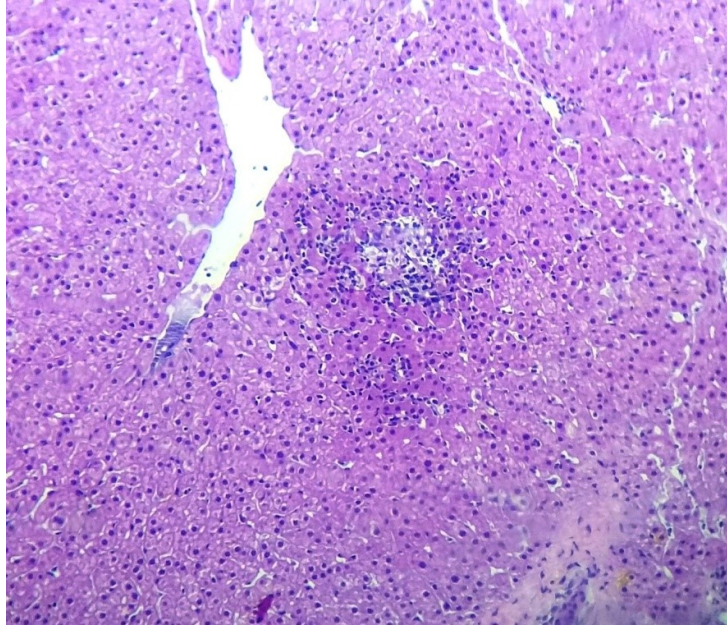


Figura 27. Hígado (10X). Infiltrado inflamatorio en la región mediozonal en ternero que consumió *Echium plantagineum* en el Experimento 1.

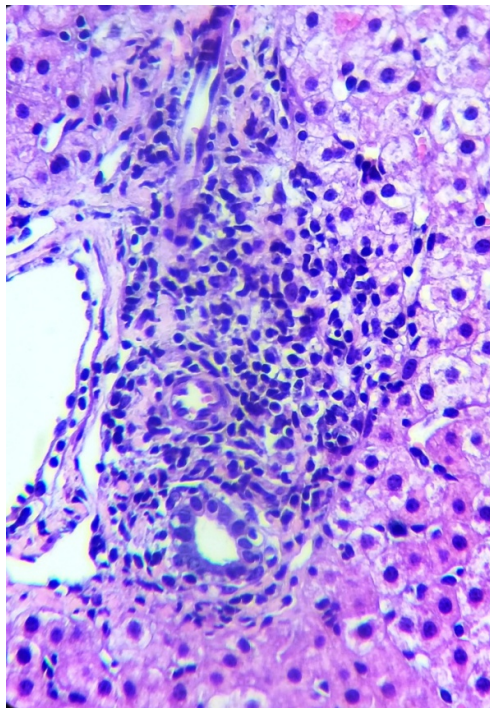


Figura 28. Hígado (100X). Infiltrado inflamatorio en la región periportal en ternero que consumió *Echium plantagineum* en el Experimento 2.

#### 6.4. Identificación y cuantificación de los AP de *Echium plantagineum*

Los resultados de los alcaloides encontrados en las muestras de la planta del predio problema y de la EEMAC se presentan en la Tabla 7.

De acuerdo a estos análisis se identificaron 4 alcaloides en todas las muestras analizadas. Los alcaloides identificados y reportados previamente en *Echium plantagineum* son: 7-angelilretroecina (238), Licopsamina, intermedina + otros isómeros (300), Echiumina (382) y Echimidina (398).

La estructura química de estos alcaloides se presenta en la Fig 29.

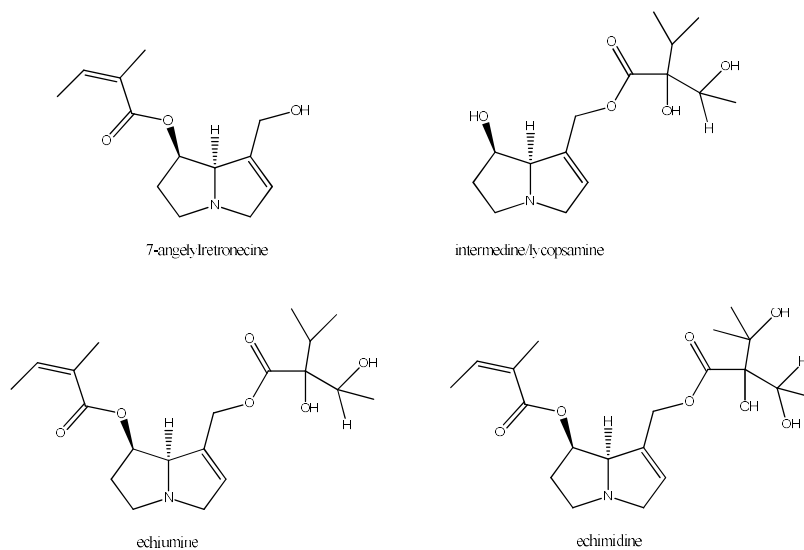


Figura 29. Estructura química de los alcaloides identificados en las muestras de *Echium plantagineum*.

Tabla 7. Concentración de los AP encontrados en las muestras de *Echium plantagineum* de distintos orígenes.

Muestra	Origen de <i>E. plantagineum</i>	7-angelilretoecina mg/g de planta seca	Licopsamina, intermedina + otros isómeros mg/g de planta seca	Echiumina mg/g de planta seca	Echimidina mg/g de planta seca	Total de AP (mg/g de planta seca)	% N- Oxide.
A	Predio problema	0,05	1,03	0,10	0,99	2,16	85,1
B	Predio problema	0,05	1,21	0,13	1,17	2,56	81,8
C	Predio problema	0,06	1,23	0,14	1,25	2,69	86,8
D	Predio problema	0,05	1,17	0,17	1,35	2,74	86,2
E	Predio problema	0,05	1,19	0,18	1,49	2,92	87,2
F	Predio problema	0,06	1,35	0,20	1,54	3,17	87,1
Promedio (muestras A a F)		0,05	1,19	0,15	1,30	2,71	85,7
G	EEMAC	0,04	0,59	0,31	1,90	2,84	83,0
H	EEMAC	0,05	0,68	0,36	2,15	3,24	78,9
Promedio (muestras G y H)		0,045	0,64	0,33	2,02	3,00	80,9

\*mg/g planta seca

## 7. DISCUSIÓN

El suministro de la planta *E. plantagineum* a bovinos no provocó signos clínicos, ni la muerte de los mismos. En cuanto a los parámetros clínicos, se puede afirmar que en ninguno de los dos experimentos se obtuvieron registros fuera de los rangos normales, ni alteraciones significativas que no estuviesen explicadas por el efecto día de experimento. En cuanto a la frecuencia respiratoria, hubo algunos registros con valores mayores al rango normal (20-50 movimientos por minuto) tanto en animales tratados como en los controles, esto puede explicarse por intensas oscilaciones individuales, excitación, movimiento y por la alta temperatura ambiental (Rosenberger, 1977). Este último factor presenta relación con los experimentos, ya que se realizaron en primavera y ese año las temperaturas oscilaron entre 21 y 27°C (Temperatura promedio máxima de Setiembre a Noviembre de 2017, Estación Meteorológica EEMAC). En relación a la frecuencia cardíaca, ésta se mantuvo dentro de los rangos normales establecidos (65-120 latidos/min) (Rosenberger, 1977).

La mayoría de los registros de temperatura rectal estuvieron dentro del rango establecido, aunque se obtuvieron valores fuera del rango, teniendo en cuenta los valores de referencia 38,5–39,5°C. Esto puede deberse a que pueden producirse variaciones de hasta 1° C durante el transcurso del día, con el punto más bajo en la mañana y más alto en la tarde (Radostits y col., 2002).

La frecuencia ruminal en todos los animales de los experimentos se mantuvo dentro de los rangos normales establecidos, teniendo en cuenta el valor de referencia 5-12 contracciones/5 min (Radostits y col, 2002).

En el estudio realizado se determinó que la planta no tuvo efecto sobre la funcionalidad hepática. La síntesis proteica no fue alterada, debido a que la concentración de proteínas totales y la albúmina se mantuvieron dentro del rango de referencia (Porth y Gaspard, 2015). Los valores de referencia utilizados para la proteína total fueron 66-80 g/L y para la albúmina sérica 30-37 g/L (Rosenberger, 1977). Según McGavin y Zachary (2009) para considerar la hipoalbuminemia como consecuencia de la insuficiencia hepática, debería de tenerse en cuenta la vida media de la albúmina sérica, que es de 21 días en el caso del bovino. Este hecho puede enmascarar la insuficiencia de la producción a nivel hepático de ésta proteína. Sin embargo, en ambos experimentos la concentración de albúmina se mantuvo sin variaciones más allá de los 21 días de iniciada la administración de la planta.

Una de las enzimas analizadas fue la AST, que es una enzima inespecífica de daño hepático, ya que el incremento puede indicar daño agudo del hígado, músculo cardíaco, esquelético y otros órganos (Rosenberger, 1977). Los valores de referencia para esta enzima, para bovinos, son de 78 a 132 U/L (Radostits y col., 2007). En los dos experimentos se encontraron valores dentro del rango de referencia establecido. La ALT, tiene como valor de referencia de 11 a 40 U/L (Radostits y col., 2007) y el aumento de ésta se debe a daño del músculo cardíaco y esquelético, así como a necrosis del hepatocito grave (Rosenberger, 1977). Generalmente cuando existe daño hepático, ambas



enzimas (AST y ALT) se encuentran elevadas (Porth y Gaspard, 2015), hecho que en estos dos experimentos no fue registrado.

La concentración de la enzima GGT en suero se mantuvo dentro del rango de referencia (6,1-17,4 U/L) (Radostits y col., 2007) en la mayoría de las muestras analizadas, a pesar de que el promedio para los tratamientos A y B, así como de los controles negativos, estuvo por encima entre 1-2 unidades. Al haber obtenido valores relativamente normales, se puede decir que no hubo daño hepático, principalmente en lo referido a la excreción biliar (Rosenberger, 1977; Porth y Gaspard, 2015).

La concentración de FAS es principalmente de origen óseo y suele estar aumentada en animales jóvenes y preñados, y todo proceso patológico que curse con actividad osteoblástica aumentada, como por ejemplo raquitismo o tumores óseos (Radostits y col., 2007). Los resultados de los valores séricos de FAS en los terneros de los experimentos estuvieron dentro del rango de referencia (0-500 U/L), (Radostits y col., 2007).

Los resultados de las enzimas hepáticas son consistentes con los hallazgos clínicos y patológicos, debido a que no existió ni signos clínicos de falla hepática crónica, ni lesiones histológicas en las biopsias hepáticas que indicaran daño en órgano. Es importante destacar que dicha conclusión se realiza en base a que los animales fueron monitoreados luego del consumo de la planta por un tiempo prudencial (165 y 137 días respectivamente 1° y 2° experimento) de manera de detectar el posible daño crónico.

Respecto a la determinación de las enzimas hepáticas, en este trabajo se tomó la precaución de realizar un muestreo de sangre con una frecuencia semanal de manera de detectar cambios que ocurrieran por corto periodo de tiempo. Esto es importante debido a que la utilización de las enzimas hepáticas para evaluar daño crónico en éste órgano, debe hacerse con cautela debido a que en los trabajos dónde se han utilizado, se ha demostrado que el incremento de las enzimas precede a la aparición de daño histológico o es transitorio, disminuyendo a los pocos días. Esto se ha observado, principalmente en casos de la intoxicación por *Senecio* spp. (Giaretta y col. 2014, Craig y col. 1991). En el trabajo reportado por Preliasco y col. (2017) las enzimas FAS, AST y GGT se incrementaron considerablemente a los 14 días del suministro de *Senecio grisebachii* y se mantuvieron elevados hasta el día 21 y 28.

Tomando como referencia los aportes de Tokarnia y col., (2000), los principales hallazgos, asociados a la lesión hepática crónica inducida por *E. plantagineum*, deberían de haber sido lesiones de fibrosis y megalocitosis. Los resultados del estudio histológico de las biopsias de hígado extraídas en los terneros de los experimentos, mostraron que no hubo alteración ni del tamaño, ni de la uniformidad de los hepatocitos. Tampoco hubo proliferación de ductos, ni fibrosis hepática. En algunas biopsias se evidenció grados leves de inflamación compuesta por linfocitos y plasmocitos, y en otras, aumento del número de células de Kupffer. Estos focos de inflamación encontrados en las biopsias, tanto de animales tratados como en los controles negativos, pueden estar

relacionados a la función propia del hígado, de defensa frente a los agentes bacterianos que ingresan desde el sistema porta (McGavin y Zachary, 2009).

Teniendo en cuenta los antecedentes reportados de la reproducción experimental de intoxicación por *E. plantagineum*, en ninguno de los trabajos se determinó la concentración y tipos de AP de las plantas utilizadas. Los alcaloides que se han identificado en las plantas fueron 7: angelilretoecina, licosamina, intermedina, echiumina y echimidina. Estos alcaloides han sido reportados en otros trabajos en especies de *E. plantagineum* (Weston y col., 2013). No existen antecedentes donde se haya intentado realizar la reproducción experimental y se conozca la concentración y tipo de alcaloides, lo que no permite saber si esto puede ser un factor determinante para el caso de la intoxicación por esta planta. Sin embargo, se conocen trabajos con diversas especies de *Senecio* spp. donde se ha determinado la concentración de alcaloides pirrolizidínicos totales y el tipo de alcaloides. En este sentido, en el trabajo reportado por Preliasco y col. (2017) con *Senecio grisebachii*, donde se logró reproducir la enfermedad a dosis de 15, 24 y 45 g/kg de peso vivo de planta seca, la concentración total de alcaloides pirrolizidínicos fue de 3,76 mg/g de planta seca, pero el tipo de alcaloide fue distinto (senecionina, seneciofilina y retrosina). En otro trabajo nacional, Garcia y col. (2018) reportan concentraciones superiores de alcaloides pirrolizidínicos totales para *Senecio brasiliensis* (17,6±7,8 mg/g de planta seca) y para *S. oxyfiulus* (6,2±3,9 mg/g de planta seca). Otras especies de *Senecio* (*selloi* y *madagascariensis*) presentaron concentraciones menores (1,8±1,3 y 0,6±0,2 mg/g de planta seca, respectivamente). Teniendo en cuenta estos resultados reportados y los de este ensayo, es probable que más allá de la concentración total de alcaloides, sea relevante para la fisiopatología de estas intoxicaciones, el tipo de alcaloide presente en las distintas especies de *Senecio* spp y de *Echium* spp.

Con relación a los efectos de los alcaloides, los trabajos se han desarrollado principalmente en animales de laboratorio (monogástricos, aves y ratones) para determinar límites de detección y efectos tóxicos, principalmente efectos carcinogénicos. En el trabajo reportado por Stegelmeier y col. (2016) se revisan diversos trabajos donde se han establecidos dosis tóxicas, pero se plantea la dificultad de la realización de estos experimentos debido a que debe aislarse cada alcaloide para probar su toxicidad. Sin embargo, se presenta un ranking de los distintos alcaloides y sus efectos tóxicos. En relación a los alcaloides determinados en este trabajo, intermedina y licopsamina fueron considerados de baja toxicidad para pollos, pero sin embargo seneciofilina y senecionina fueron considerados de alta toxicidad. Por lo tanto, esto puede explicar por qué el *Senecio* spp. en Uruguay es una de las principales plantas tóxicas del país (Buroni, 2014; Garcia y col, 2018) y en cambio *E. plantagineum* presenta escasos reportes.

Otro aspecto a considerar es que la sola presencia de los alcaloides en la planta no determina que la misma sea tóxica para los bovinos. Esto es debido a que los rumiantes tienen una ventaja respecto a especies monogástricas en relación a la metabolización de los alcaloides. Para los rumiantes, la actividad de los microorganismos del rumen permite la metabolización de los AP, lo que los hace más resistentes con relación a las especies monogástricas. Estas

consideraciones proporcionan una explicación al hecho de que la toxicidad de los AP es diferente, en diferentes especies e individuos. Por ejemplo, mientras que los caballos son muy sensibles a la intoxicación por AP, las ovejas, las cabras y el ganado son más resistentes y toleran dosis de AP más altas (Wiedefeld y Edgar., 2011).

Como se ha demostrado en muchos experimentos, la vía metabólica de la intoxicación y detoxificación de AP parece ser la misma en todos los animales y también en humanos (IPCS 1989), se puede suponer que las tasas relativas de activación de AP y desintoxicación de AP en las diferentes especies y en diferentes individuos determina las diferentes susceptibilidades a la intoxicación por AP (Wiedefeld y Edgar, 2011). Los rumiantes muestran proceso de detoxificación muy efectivo, debido a que contienen en el rumen, microorganismos que por hidrogenólisis, escinden el enlace de éster de C9 de los AP para liberar los ácidos necicos y producir metabolitos de 1-metileno pirrolizidina, que no son tóxicos (Lanigan y Smith, 1970; Lanigan,1971).

## 8. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo no se logró reproducir la intoxicación por *E. plantagineum* en bovinos cuando se utilizaron dosis de 14 y 14,3 g de planta seca por kilogramo de peso vivo.
- En las plantas de *E. plantagineum* utilizadas en la reproducción experimental se identificaron los alcaloides pirrolizidínicos 7-angelilretoecina, licopsamina, intermedina, echiumina y echimidina.
- El tipo de alcaloides que contiene *E. plantagineum*, la concentración total de alcaloides, la dosis total que los animales consumieron y la metabolización de los mismos en el rumen son factores que pueden explicar por qué la planta no resultó tóxica para los bovinos de estos experimentos.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adrien Delgado L (2014). La biopsia hepática en ovinos y bovinos como herramienta diagnóstica. Revista de la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”. N° 35. PP. 22- 27. Cangüe Digital. Paysandú, Uruguay.
2. Buroni Zeni F (2014). Caracterización de la demanda de diagnóstico en bovinos y ovinos en el período 1993-2013, utilizando una base de datos relacional en el litoral oeste del Uruguay. Disponible en <http://www.fvet.edu.uy/images/ContenidoMenu/Biblioteca/TesisdeGrado2014/FV-31016.pdf>. Fecha de consulta 10/5/18.
3. Cópola B; César D (2014). Aspectos a tener en cuenta en la intoxicación por “Flor morada” o “Lengua de vaca”. Revista Plan Agropecuario N°151, pp. 60-63. Disponible en: [https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R151/R\\_151\\_60.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R151/R_151_60.pdf). Fecha de consulta: 11/10/17.
4. Craig A.M; Pearson E; Meyer C; Schmitz A (1991). Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic- delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. Am J Vet Res. 52: 1969-1978
5. Craig AM; Blythe LL; Lassen ED; Slizeski ML (1986). Resitance of sheep to pyrrolizidine alkaloids. Isr J Vet Med 42: 376–384.
6. Culvenor CCJ; Jago, M; Peterson J ; Smith L; Payne L; Campbell D; Edgar J; Franh J (1984). Toxicity of *Echium plantagineum* (Paterson Curse). I Marginal Toxic Effects in Merino Wethers from long- term Feeding. Aust. J. Agric. Res. 35: 293-304.
7. Dayce KM; Sack WO; Wensing CJG (1999). Anatomia Veterinaria. 2° Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
8. Estación meteorológica de la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni. Disponible en: <https://ingbio.paap.cup.edu.uy/~estmet/NOAAPRYR.TXT>. Fecha de consulta: 5/12/2018.
9. García J; García y Santos C; Rosas J; Dutra F; Gardner D (2018). A survery of *Senecio* spp. affecting livestock in Uruguay and their associated pyrrolizidine alkaloid content. Ciencia Rural. 48 (2). e20170621, <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170621>.
10. García J; Romero A; Quinteros C; Dutra F (2016). Análisis retrospectivo de intoxicaciones asociadas a plantas toxicas, micotoxinas y otros compuestos en bovinos de la Región Este de Uruguay. XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. pp 1-5.

11. García y Santos C; Capelli A (2016). Intoxicaciones por plantas y micotoxinas en rumiantes diagnosticadas en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(201):28-42.
12. Gardner D.R; Thorne M.S; Molyneux R.J; Pfister J.A; Seawright A.A; (2006). Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 736e744.
13. Giaretta PR; Panziera W; Hammerschmitt ME; Bianchi RM; Galiza GJN; Wiethan IS; Bazzi T; Barros CSL (2014). Clinical and pathological aspects of chronic *Senecio* spp. poisoning in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(10):967-973.
14. International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1989) Pyrrolizidine alkaloids health and safety guide. Health and safety guide no. 26. WHO, Geneva. P 23. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39808/9241543477-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de consulta: 28/07/2018.
15. Lanigan GW (1971) Metabolism of pyrrolizidine alkaloids in the ovine rumen. III The competitive relationship between heliotrine metabolism and methanogenesis in rumen fluid in vitro. *Aust J Agric Res* 22:123–130.
16. Lanigan GW, Smith LW (1970). Metabolism of pyrrolizidine alkaloids in the ovine rumen. *Aust J Agric Res* 21: 493–500.
17. Maclachlan NJ; Cullen JM (1995). Liver, biliary system, and exocrine pancreas. In: Carlton, W. W., McGavin, M. D. Thomson's Special Veterinary Pathology. 2nd ed., Mosby-Year Book. Inc. St. Louis.
18. McGavin Donald M, Zachary James Z (2009). Bases da Patologia Veterinaria. 4ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 393-461.
19. Méndez M; Riet- Correa F; Schild A; García J (1985). Intoxicação por *Echium plantagineum* (Boraginaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. Laboratorio Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., Univ. Fed. Campus Universitario, Pelotas. p. 57-64
20. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (2016). Estadísticas Agropecuarias DIEA. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>. Fecha de consulta: 13/11/17.

21. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (2018). Estadísticas Agropecuarias DIEA. Disponible en: [https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario\\_2018.pdf](https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf). Fecha de consulta: 5/12/2018.
22. Moraes J; Zanoniani R; Rivero R (2009). Plantas tóxicas y toxinas fúngicas como fuente de eventuales pérdidas en sistemas productivos. Jornadas la investigación en la educación superior. Aportes para la reflexión. Instituto de formación docente y Centro Universitario de Paysandú. CD ROM.
23. Peterson JE; Jago MV (1984). Toxicity of *Echium plantagineum* (Peterson's Curse) pyrrolizidine alkaloids Poisoning in Rats. Aust. J. Agric. Res. 35: 305-315.
24. Porth M; Gaspard K (2015) Essentials of pathophysiology : concepts of altered health states, 3ra ed., Walters Kluwer,
25. Preliasco M; Gardner D; Moraes J; González A; Uriarte G; Rivero R (2017). Senecio grisebachii Baker: Pyrrolizidine alkaloids and experimental poisoning in calves. Toxicon 133: 68-73.
26. Radostits O; Gay C; Hinchcliff K; Constable P (2007). Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10a ed. Saunders Ltd. p: 2065.
27. Radostits OM (2002). Exploración clínica de bovidos y terneros. En: Radostits, O.M., Mayhew, I.G., Houston, D.M. Fichas Médicas Veterinarias. Examen y Diagnóstico Clínico en Veterinaria. Madrid, Elsevier. p 151-177.
28. Riet-Alvariza F; Riet Correa F; Perdomo E; Corbo M; Del Puerto O; Moyna P; Altamirano J; Meny H; McCoscker P (1977). Jornadas de Buiatría Quintas uruguayas, Paysandú. P.ii/1-ii/11.
29. Riet-Correa F; Medeiros R (2001). Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde publicam. Pesquisa Veterinaria Brasileira 21(1): 38-42.
30. Riet-Correa F; Méndez M; Schild A (1991). Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Montevideo, Agropecuaria Hemisferio Sur. 340 p.
31. Riet-Correa F; Rivero R; Schild A (2007). Micotoxicosis en animales domésticos em pastoreo. Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXV, Paysandú, Uruguay, p. 116- 130.
32. Riet-Correa F; Schild A; Méndez M; Oliveira J; Gil-Turnes C; Gonçalves A (1983) Laboratório Regional de Diagnóstico Relatório de Atividades e Doenças da Área de Influencia no Período 1978/1982. Ministério Da

educacion e Cultura Universidade Federal de Pelotas. Editora da Universidade. Pelotas.

33. Riet-Correa; Schild A; Lemos R; Borges J (2007). Doenças de ruminantes e eqüideos. 3ª edição. Vol. 2, pp. 106-111. Editorial Palloti. Santa Maria.
34. Rivero R; Matto C; Dutra F; Riet-Correa F (2011). Toxic plants and mycotoxins affecting cattle and sheep in Uruguay. En: Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins. Ed CAB International, vol 2, p. 25-34
35. Rivero, R; Matto, C; Dutra, F; Riet-Correa, F (2009). Toxic plants affecting cattle and sheep in Uruguay. 8th International Symposium on Poisonous Plants. Program and Abstracts. João Pessoa-Paraíba, Brazil, 1 p.
36. Rosenberger G (1977). Exploración Clínica de los Bovinos. Berlin, ed. Paul Parey. 445 p.
37. Seaman JT; Turvey WS; Ottaway SJ; Dixon RJ and Gilmour AR (1989). Investigations into the toxicity of *Echium plantagineum* in sheep. Aust Vet J 66:279-285.
38. Stalker MJ; Hayes MA (2007). 2. Liver and biliary system. En: Jubb, Kennedy and Palmer's, Pathology of domestic animals. 5<sup>th</sup> Edition. 3 Volume Set. Pp. 297-388.
39. Stegelmeier B; Colegate S; Brown A (2016). Dehydropyrrolizidine alkaloid toxicity, cytotoxicity, and cacinogenicity. Toxins, 8: 356. doi:10.3390/toxins8120356.
40. Tokarnia C.H; Döbereiner J; Peixoto P (2000). Plantas toxicas do Brasil. Rio de Janeiro. Helianthus. 310 p.
41. Tokarnia C; de Farias M; Barbosa J; Vargas P; Döbereiner J (2012). Plantas Tóxicas do Brasil. Para animais de produção. 2ª ed. Editorial Helianthus. 586p.
42. Weston PA; Weston LA; Hildebrand S (2013). Metabolic profiling in *Echium plantagineum*: presence of bioactive pyrrolizidine alkaloids and naphthoquinones from accessions across southeastern Australia. 12:831–837.
43. Wiedenfeld H; Edgar J (2011). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants: Phytochemistry Reviews 10:137–151.