

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

INTOXICACIÓN EXPERIMENTAL POR *Lathyrus hirsutus*

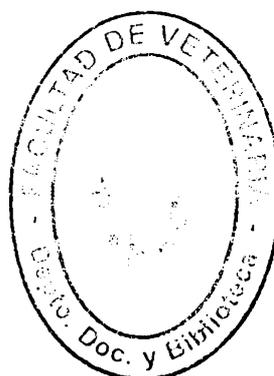
EN BOVINOS

por

ALDECOA, Cyntia

FRANCO, Cecilia

MOREIRA, Gabriela



TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: **Medicina Veterinaria e
Higiene, Inspección-Control y Tecnología
de los Alimentos de Origen Animal**

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**



PAGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

.....

Dr. Antonio Moraña

Segundo Miembro (Tutor):

.....

Dra. Carmen García y Santos

Tercer Miembro:

.....
Dr. Carlos Morón

Cuarto Miembro (Cotutor):

.....
Dra. Elena de Torres

Fecha:

21/12/2010

Autores:

.....

Cyntia Aldecoa Piriz

.....

Cecilia Franco Ottonello

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 9 (nueve) votos

.....
Gabriela Moreira Curbelo

A mi amiga, casi hermana Ceci Franco, por aguantarme en las buenas
y muy malas; a Gaby y Pablo por estar.
Y muy especialmente a mi madre, Livia Piriz, por alentarme
para salir adelante siempre.
Además, me gustaría agradecer a Dra. Carmen García y Santos, nuestra
tutora, por ayudarnos a emprender este trabajo, y estar siempre.

Cyntia Aldecoa Piriz

A mi familia, los que están a mi lado y los que me acompañan desde arriba,
a mi esposo, a mis compañeras de Tesis y a Carmen que sin su paciencia no
lo hubiésemos logrado, mis amigas, amigos, a todos, que de alguna forma
fueron parte de este sueño que hoy se hace realidad...

Cecilia Franco Ottonello

A mis compañeras de tesis, Cecilia y Cyntia por ayudarme e impulsarme
siempre hacia adelante, a nuestra tutora, Carmen por siempre
tener una palabra de aliento y de confianza.
A mi mejor amiga, mi mamá, Susana Curbelo por estar conmigo en cada
paso que di y que daré, a mi esposo Diego, por ayudarme a no desistir
y a nuestra dulce Agus, por enseñarme a ser mamá y a ser Profesional.
A mi hermano, Javier y el resto de mi familia presente y pasada,
todos ellos han hecho algo para que yo hoy esté acá, no como un final,
sino como el principio de algo realmente apasionante, muchas gracias....

Gabriela Moreira Curbelo

AGRADECIMIENTOS:

- ❖ A las Dras. Carmen García y Santos y Elena De Torres; por su apoyo incondicional y la disponibilidad que nos prestaron para enseñarnos el camino a seguir, tanto en Montevideo como en San José... Gracias.
- ❖ Al Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE "Miguel Rubino" de Paysandú, por el procesamiento de muestras, especialmente al Dr. Rodolfo Rivero.
- ❖ A los Dres. del Laboratorio Regional de Diagnóstico de la Universidad Federal de Pelotas, Río Grande del Sur, Brasil, para su asesoramiento y realización del estudio ultraestructural de las muestras enviadas.
- ❖ A los Dres. Ariel Alvez y Sergio Gonzáles, que nos acompañaron en las arduas jornadas de colecta de planta y nos brindaron su enseñanza en San José
- ❖ Al Docente William Pérez que nos ayudó con la revisión bibliográfica, colaboró con los traslados y la colecta de la planta y nos facilitó espacio físico para su secado.
- ❖ Al Dr. Martino y todo su equipo del Laboratorio de Análisis Clínicos que nos ayudaron a realizar los estudios clínicos a los animales.
- ❖ Al Dr. Moraña de la cátedra de Patología que nos brindó su ayuda para que pudiésemos tener los resultados de la anatomía patológica.
- ❖ Al Lic. Eduardo Alonso, Botánico de la Facultad de Química, que nos enseñó técnicas y nos facilitó material.
- ❖ Al Dr. Gonzalo Suárez por su asesoramiento y enseñanza del uso de fármacos para derribo y eutanasias de los animales.
- ❖ Al todos los integrantes de la Cátedra de Toxicología que nos brindaron su apoyo y su paciencia durante el procesamiento de la planta secado y molido y durante el experimento II.
- ❖ Al Br. Matías Larrosa por sus largas horas separando chauchas.
- ❖ Al Br. Santiago Sosa, por ayudarnos desinteresadamente con los animales del experimento II.
- ❖ A las Dras. Sandra Palleiro, Elisa Rodríguez, Dr. Ariel Canteras y el Br. José Luis de Armas, profesionales a cargo de los casos clínicos presentes en la localidad de Sauce, por aportarnos información y proporcionarnos acceso a los predios problema.

- ❖ A los propietarios del Establecimiento “El Orejano”; Punta de Valdéz, San José que nos abrieron las puertas de su establecimiento y de su casa para la colecta de la planta para las experiencias.
- ❖ A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación de este trabajo.
- ❖ Y finalmente a todos los que se acercaron, familiares, amigos y compañeros que de una forma u otra caminaron junto a nosotras y pusieron su granito de arena. Mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
1. RESUMEN.....	1
1. SUMMARY.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO <i>Lathyrus</i>	5
3.2. LATIRISMO.....	8
3.3. PRINCIPIOS TÓXICOS DE <i>Lathyrus</i>	8
3.3.1. Aminoácidos.....	9
3.3.2. Aminoácidos no- proteicos que causan Latirismo.....	9
3.3.3. Mecanismo de acción de los aminopropionitrilos.....	10
3.4. ¿DONDE ACTÚAN LOS AGENTES LATIRÓGENOS?.....	10
3.4.1. Proteínas estructurales y fibrosas.....	10
3.4.2. Colágeno y elastina.....	11
3.5. COLÁGENO.....	11
3.5.1. Formación del colágeno.....	12
3.6. TIPOS DE COLÁGENO.....	13
3.6.1. Colágenos mayores.....	13
3.6.2. Nuevos tipos de colágeno.....	14
3.6.3. Colágenos menores.....	14
3.6.4. Enfermedades que afectan el colágeno.....	15
3.7. ESTUDIO QUÍMICO DE AGENTES LATIRÓGENOS.....	17
3.8. DIFERENTES PRESENTACIONES DE LATIRISMO.....	17
3.8.1. Neurolatirismo.....	17
3.8.2. Angiolatirismo.....	18
3.8.3 Osteolatirimo.....	18
3.9. OSTEOLATIRISMO POR <i>Lathyrus hirsutus</i>	20

3.9.1. Evidencia experimental de cuadros de intoxicación por <i>Lathyrus hirsutus</i>	20
3.10. INTOXICACIÓN NATURAL POR <i>Lathyrus hirsutus</i> EN URUGUAY ..	21
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo General.....	25
5.2. Objetivos específicos.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Experimento I.....	26
6.1.1. Instalaciones.....	26
6.1.2. Recolección de la planta.....	27
6.1.3. Conservación y procesamiento de la planta.....	28
6.1.4. Selección de animales.....	28
6.1.5. Metodología.....	29
6.1.6. Cantidad y forma administración de <i>Lathyrus hirsutus</i>	29
6.2. Experimento II.....	30
6.2.1. Instalaciones.....	30
6.2.2. Recolección de la planta.....	30
6.2.3. Procesamiento de <i>Lathyrus hirsutus</i>	31
6.2.4. Selección de animales.....	32
6.2.5. Cantidad y forma de administración.....	33
6.2.6. Eutanasias y necropsias.....	34
6.3. Análisis microhistológico para la identificación de la epidermis de <i>Lathyrus hirsutus</i>	35
6.4. Cromatografía en capa fina (TLC).....	35
7. RESULTADOS	36
8. DICUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	45
10. BIBLIOGRAFÍA	46

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros

Cuadro I: Animales de Experimento I.....	28
Cuadro II: Animales de Experimento II.....	33

Figuras

Figura 1) <i>Lathyrus hirsutus</i> en floración, Establecimiento “El Orejano”, San José. 2006.....	6
Figura 2) <i>Lathyrus hirsutus</i> : Planta con sus flores, hojas y frutos. San José. 2006.....	7
Figura 3) <i>Lathyrus hirsutus</i> : Fruto, San José. 2006.....	7
Figura 4) <i>Lathyrus hirsutus</i> : planta entera con fruto maduro, San José. 2006...8	
Figura 5) Estructura del Procolágeno I. a) Dominio compacto; b) Triple hélice corta (10-12 mm); c) Telopéptido; d) Dominio globular. (Fuente: Serra, 1983).....	12
Figura 6) Enfermos de latirismo en la India. Fotografía de Arun Chadha, por cortesía de Sunil Deepak. (Calvo, 2007).....	17
Figura 7) Ubicación de los brotes epidemiológicos en nuestro país.....	22
Figura 8) Infraestructura donde se llevó a cabo la Experimento I.....	27
Figura 9) Colecta de <i>Lathyrus hirsutus</i> , Establecimiento “El orejano”, San José.....	27
Figura 10) Almacenamiento de la planta colectada.....	28
Figura 11) Ternero N° 122 alimentándose de la planta.....	30
Figura 12) Colecta de <i>L. hirsutus</i> para Experimento II.....	31
Figura 13) Planta colectada para su posterior procesamiento.....	31
Figura 14) Vainas separadas para su secado.....	32
Figura 15) Tracción pasiva y excesiva de miembros posteriores, Terero 1.....	36
Figura 16) Fotografía que muestra posición de los garrones, Ternero 1.....	37
Figura 17) Articulación coxofemoral derecha, Ternero 1.....	38

Figura 18) a) Flexor superior, Ternero 1, vista panorámica, se observan gran cantidad de vacuolas e infiltrado inflamatorio, b) Mismo tejido a mayor aumento.....	39
Figura 19) TLC de <i>Lathyrus hirsutus</i> (2009).....	40
Figura 20) Fotografía de análisis microhistológico, método directo, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria (2006).....	41
Figura 21) Fotografía de análisis microhistológico, por liofinizado, Botánica, Facultad de Química (2010).....	41

RESUMEN

Lathyrus hirsutus L. (Fabaceae) conocida como "arvejilla" fue relacionada con brotes naturales de rigidez de las extremidades, incoordinación y xifosis en bovinos, en los últimos años en los departamentos de Canelones y San José. Dicha planta no había sido descrita como tóxica en Uruguay, pero sí en otras regiones del mundo. Para comprobar la toxicidad de *L. hirsutus*, se realizaron dos experimentos. En el primero, 3 terneros Holando de 90 kg. de peso promedio recibieron durante 30 días, partes aéreas de planta fresca entera en dosis de 1%, 2% y 3% de su peso vivo y un cuarto ternero permaneció como control. Estos terneros no manifestaron signos clínicos de intoxicación. En el segundo experimento, 2 terneros Holando de 108 kg de peso promedio, recibieron durante 9 y 7 días respectivamente, vainas y semillas de planta seca y molida en dosis de 0,9% de su peso corporal, otros 2 terneros fueron utilizados como control. Estos terneros presentaron ataxia, astasia, resistencia a moverse y pararse. En la cromatografía en capa fina (TLC) el extracto etanol/agua (7/3) de la planta reveló con ninhidrina una mancha azul-verdosa inestable. Muestras de epidermis de la planta fueron procesadas por análisis microhistológico presentando células de bordes sinuosos, estomas de 16 micrones de largo, ranunculáceos y cutícula estriada. Los resultados obtenidos presumen que *L. hirsutus* es tóxica para bovinos y que el diagnóstico de la intoxicación debería ser epidemiológico y clínico.

SUMMARY

Lathyrus hirsutus L. (Fabaceae) known as "arvejilla" was related to natural outbreaks the stiffness in limbs, incoordination and kyphosis. in the last years in the departments of Canelones and San Jose. This plant had not been reported as toxic in Uruguay, as it was in other regions of the world. To verify the toxicity of *L. hirsutus*, two experiments were designed. In the first one, three Holstein calves of 90 kg of average weight received during 30 days, aerial parts of fresh plant at doses of 1 %, 2 % and 3 % of their body weight respectively, while a fourth calf remained as control. No clinical signs of poisoning were demonstrated in these calves. In the second experiment, two Holstein calves

with an average weight of 108kg, received during 9 and 7 days respectively, pods and seeds of dry and grinded plant at a dose of 0,9 % of their body weight, other two calves were used as control. These calves presented; ataxia, astasia, resistance to move and to stand up. Thin layer chromatography (TLC) with ninhydrin from the ethanol/water (7/3) extract of the plant revealed an unstable blue-greenish spot. Samples of plant epidermis, processed for microhistology showed cells with sinuous edges, stomas of 16 microns length, ranunculáceos and fluted cuticle. Through the results obtained the toxicity of *L. hirsutus* for bovines is presumed and that the diagnosis of the poisoning must be based on epidemiological and clinical data.

2. INTRODUCCIÓN

Plantas tóxicas de interés pecuario, son las que al ser ingeridas en condiciones naturales por los animales domésticos, causan daños a la salud, pudiendo ocasionar la muerte y cuya toxicidad debe ser comprobada por reproducción experimental (Tokarnia y col., 2000).

Las plantas que producen intoxicaciones son un problema importante en bovinos en condiciones de pastoreo en todo el mundo y en nuestra región. En Uruguay, en los últimos diez años, los Laboratorios Regionales de Diagnóstico de Treinta y Tres y Paysandú, consideran que las muertes de bovinos por plantas tóxicas, diagnosticadas en laboratorio son de 16% y 10% respectivamente (Rivero y col., 2009).

En Uruguay, existe una población de 11.913 millones de bovinos, (D.I.E.A., 2009). Se estima que anualmente muere el 5% del rodeo vacuno en Río Grande del Sur y Uruguay (Riet-Correa y Medeiros, 2000). Si calculamos el porcentaje estimado de muertes por plantas tóxicas en un 13% (Rivero y col., 2009), serían 77.434 animales muertos por esta causa, lo que se traduce en cientos de millones de dólares de pérdidas.

Las muertes de animales debido a intoxicaciones por plantas son las únicas pérdidas estimadas, a estas se les deben sumar otras pérdidas directas e indirectas, no calculadas. Otras pérdidas directas no estimadas son causadas por, disminución de los índices reproductivos (abortos, infertilidad, malformaciones), reducción de la productividad de los animales (leche, carne y lana) y otras enfermedades subclínicas y patologías asociadas a la depresión inmunológica (Riet-Correa y Medeiros, 2001).

Las pérdidas indirectas incluyen los costos para controlar las plantas tóxicas, medidas de manejo para evitar las intoxicaciones y depreciación de las tierras, gastos asociados al diagnóstico y tratamiento de los animales afectados (Riet-Correa y Medeiros, 2001). El diagnóstico es muy difícil, se basa en la identificación de la planta, estudios epidemiológicos, caracterizaciones clínicas patológicas del cuadro y pruebas de laboratorio (Riet-Correa y Méndez, 1993).

Una herramienta para confirmar el consumo de una planta, es la técnica del microanálisis. Mediante ésta, se identifican especies vegetales por las características epidérmicas (Dusi, 1949; Holechek y col., 1982). Estudiando el contenido ruminal o gastrointestinal y materia fecal de animales intoxicados, se comparan las epidermis halladas en las muestras con las de la planta sospechosa (Panter y col., 1987; Yagueduú y col., 1998; Yagueduú y col., 2000; García y Santos y col., 2004).

El número de plantas conocidas como tóxicas para rumiantes y equinos aumenta constantemente al mejorar los diagnósticos. Se conocen en nuestro país 31 especies de plantas tóxicas pertenecientes a 26 géneros (Rivero y col., 2009).

Otras especies vegetales tóxicas se han estudiado en los últimos años en la Facultad de Veterinaria y en los laboratorios DILAVE de Paysandú y Treinta y Tres, aumentando el número de plantas tóxicas, *Quercus robur* (Arruti, Ferrés y Trelles, 2007); *Senecio grisebachii* (Monroy y Preliasco, 2008); *Senecio madagascariensis* (Ferreira y Fumero, 2008) y *Nierembergia rivularis* (Etcheberry, Goyen y Pereira, 2008).

En noviembre, durante los últimos años se registraron brotes sospechosos de intoxicación por una planta, *Lathyrus hirsutus*, conocida popularmente como “arvejilla”, no registrada como tóxica en Uruguay. En ese momento nace la inquietud de investigar la posible toxicidad de *Lathyrus hirsutus* en bovinos, especie afectada en los brotes naturales. En el presente trabajo se presenta una revisión bibliográfica de latirismo y se describe la intoxicación natural y experimental por *Lathyrus hirsutus* en bovinos.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO *Lathyrus*

El género *Lathyrus* pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Leguminosae, Papilionoideae (Bruneton, 2001). Comprende unas 160 especies distribuidas en ambos hemisferios. En nuestro país estaban descritas varias especies; *L. odoratus*, *L. latifolius* (Lombardo y Muñoz, 1980), *L. crassipes*, *L. paranensis*, *L. pubescens*, *L. subulatus*, *L. tormentosus*, *L. nervosus*, (Lombardo, 1982) y posteriormente Izaguirre y Beyhaut (1998), describieron a *Lathyrus hirsutus*.

Las especies de *Lathyrus*, son hierbas anuales o perennes, trepadoras mediante zarcillos foliares o erectas con tallos muchas veces alados. Su fruto es una legumbre nacida de un solo carpelo, lineal, a veces ancha aplanada, dehiscente y pluriseminada (Lombardo y Muñoz, 1980; Lombardo, 1982).

Poseen flores zigomorfas con un pétalo dorsal que cubre los dos pétalos que a su vez cubren los dos pétalos ventrales que forman la carena o quilla, (Bruneton, 2001) con colores variados, azules o azul violáceos, rojas, blancas o amarillas, dispuestas en racimos axilares, en corto número o numerosas, rara vez solitarias (Lombardo y Muñoz, 1980; Lombardo, 1982).

Este género, por su alto contenido en proteínas, cerca de 25% y carbohidratos (350 cal/100g), tiene numerosas especies que son utilizadas en la dieta humana y animal. Son de fácil cultivo, crecen rápidamente, resisten pestes, fijan nitrógeno y además sobreviven a condiciones climáticas extremas (Spencer y col., 1985).

Los principios tóxicos de estas especies están presentes en toda la planta, pero se concentran en mayor proporción en las semillas y legumbres de las mismas (Barceloux, 2008).

Lathyrus hirsutus, perteneciente a este género, se denomina comúnmente arvejilla o "Guisante Caley", es una legumbre anual de temporada fresca que puede cultivarse en zonas muy húmedas o calcáreas y también en tierras débilmente ácidas a diferencia de otros tréboles anuales (Mosjidis y Owsley, 2002).

L. hirsutus, presenta una talla de hasta 1,2 m, flores de color violáceo, que miden de 7 a 15 mm, en racimos de 2 a 4 flores (Izaguirre y Beyhaut, 1998) tiene vainas de 2,54 a 4,40 cm de largo, y 0,64 cm de ancho, plano, peludo, muchas cabezas de serie, dividida en dos mitades que se trenzan cuando se secan (Beasley, 1999).

Es una especie oriunda del mediterráneo y sudoeste de Asia. Se utiliza como forraje anual de invierno o de cobertura de leguminosas en el sur de EE.UU., California y Oregon (Beasley, 1999). En nuestro país, esta presente en Montevideo y Canelones (Izaguirre y Beyhaut, 1998) y San José (Alonso, comunicación personal, 2009), (Fig.1,2,3 y 4).

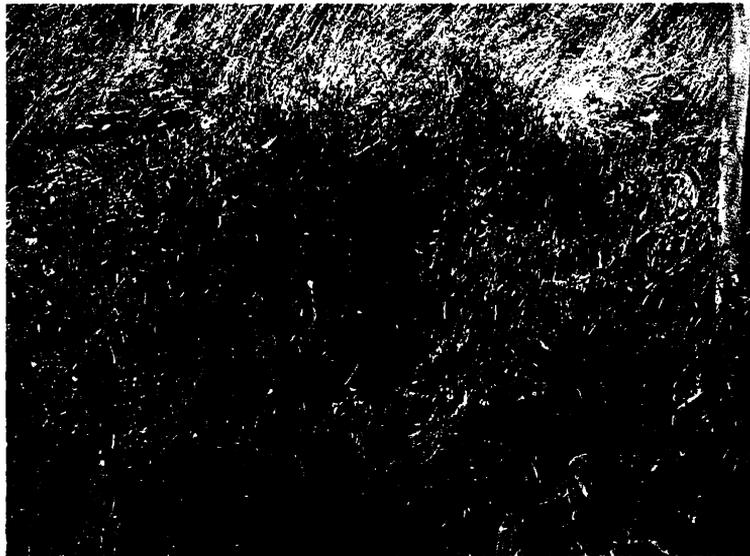


Figura 1) *Lathyrus hirsutus* en floración, Establecimiento "El Orejano", San José.2006.



Figura 2) *Lathyrus hirsutus*: Planta con sus flores, hojas y frutos.

San José. 2006.



Figura 3) *Lathyrus hirsutus*: Fruto, San José. 2006.

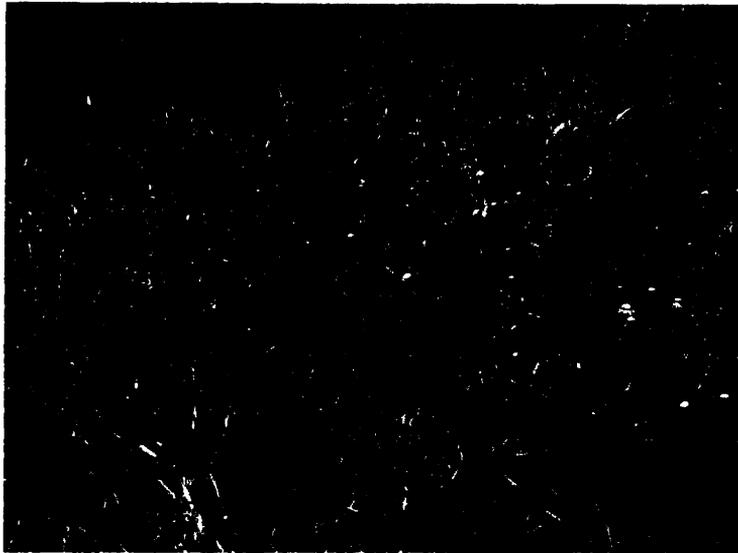


Figura 4) *Lathyrus hirsutus*: planta entera con fruto maduro,
San José. 2006.

3.2. LATIRISMO

Latirismo es la intoxicación causada por el consumo de especies de *Lathyrus*. Se conocen diferentes cuadros de esta enfermedad, neurolatirismo, angiolatirismo y osteolatirismo; siendo el más común el neurolatirismo (Haque y col., 1996).

El cuadro de neurolatirismo se ve más en humanos; donde se produce una degeneración irreversible y no progresiva de la médula espinal (Haque y col., 1996). Los cuadros de angiolatirismo y osteolatirismo, son más comunes en animales (Knight y Walter, 2003).

3.3. PRINCIPIOS TÓXICOS DE *Lathyrus*

Los cuadros de Latirismo se asocian al consumo de semillas de *Lathyrus* que contienen aminoácidos no proteicos que actúan como agentes tóxicos (Knight y Walter, 2003).

Los principios tóxicos se concentran más en vainas y semillas (Barceloux, 2008). El efecto tóxico se manifiesta en humanos, cuando su consumo representa una gran proporción de la dieta (más del 30% total) en un período de semanas o meses (Calvo, 2007).

Los agente tóxicos presentes en las plantas del género *Lathyrus* son estables al calor (24 horas a 80°, 6 horas a 120° en autoclave). La porción tóxica se extrae fácilmente con alcohol al 30% (Lewis y col., en 1948). Otro método para detoxificar es remojando las semillas durante la noche y eliminando el agua o se puede hacer la cocción con cambios de agua (Valle Vega y Lucas, 2000).

3.3.1. Aminoácidos

Los aminoácidos se dividen en proteicos y no proteicos, que en su forma libre pueden ser tóxicos y suelen estar presentes en las plantas superiores. Los aminoácidos no proteicos, a su vez pueden ser análogos a los aminoácidos proteicos (canavanina, mimosina) y aminoácidos raros con estructura diferente, como el agente que causa el Latirismo (Valle Vega y Lucas, 2000).

3.3.2. Aminoácidos no-proteicos que causan Latirismo

El β -N-oxalyl-L- α - β -diaminopropiónico, conocido también como ODAP o BOAA, que mimetiza al glutamato y produce la muerte neuronal por sobre estimulación y sus derivados (Spencer, 1995).

El β -N-(γ -L-glutamino) aminopropionitrilo, es un causante de osteolatirismo y produce anormalidades en el esqueleto. Inhiben los enlaces de las cadenas de colágena y elastina, lo cual resulta en músculos débiles y fragilidad en las paredes de los capilares sanguíneos (Strong, 1966).

3.3.3. Mecanismo de acción de los aminopropionitrilos

En los animales que han consumido agentes latirógenos se presentan una serie de características como son: el debilitamiento de los tendones y ligamentos, problemas en cartílagos, piel y cicatrización de heridas, pudiendo haber también deformaciones en el esqueleto (Levene y Groos, 1959).

L. hirsutus contiene β -aminopropionitrilo (BAPN), responsable de la enfermedad llamada osteolatirismo (Strong, 1966), toxina que actúa inhibiendo la enzima lisil oxidasa, disminuyendo así la cantidad de enlaces cruzados en las cadenas polipeptídicas de elastina y colágeno. La deficiencia de estos enlaces produce debilidad de los huesos, cartílagos y músculos, aumentando también la fragilidad de los capilares sanguíneos (Levene y Gross, 1959).

Entonces, al inhibir la enzima lisil oxidasa, hay una falla en la polimerización de las moléculas del tropocolágeno de las fibras de colágeno, al no producirse una buena conformación de los polipéptidos del tropocolágeno, hay un posterior déficit en estos enlaces cruzados que normalmente hacen que la estructura del colágeno, sea fuerte y estable, como consecuencia hay fragilidad del mismo (Levene, 1966).

3.4. ¿DÓNDE ACTÚAN LOS AGENTES LATIRÓGENOS?

3.4.1. Proteínas estructurales y fibrosas

Las proteínas están formadas por un determinado número de aminoácidos, unidos en una secuencia peptídica específica, esto hace que tengan una configuración tridimensional (Bloom y Fawcett, 1995).

El colágeno es una proteína estructural que forma la mayor parte del armazón proteico del tejido conjuntivo, el cartílago y el hueso, tiene la capacidad para interactuar con otras proteínas de su misma clase como proteínas musculares, queratina del pelo y piel para formar estructuras fibrosas reticulares (Bloom y Fawcett, 1995).

Las proteínas fibrosas confieren protección externa, están presentes en piel, pelo, plumas, uñas y cuernos, proporcionando soporte, siendo componentes primordiales de tejido conjuntivo (tendones, cartílago, huesos, y capas profundas de la piel). Las más conocidas son la α -queratina del pelo y lana, la fibroína de la seda y el colágeno de los tendones (Lehninger, 2006).

3.4.2. Colágeno y elastina

El tejido conjuntivo, está constituido por elementos estructurales y de soporte siendo la mayor parte del tejido orgánico en los animales superiores. Forma parte de tendones, ligamentos, cartílago, matriz orgánica de huesos, vasos sanguíneos, forma la capa profunda de la piel y mantiene las células juntas en los diferentes tejidos formando la sustancia básica extracelular (Lehninger, 2006).

Existen tres componentes básicos en el tejido conjuntivo, dos son proteínas fibrosas, la elastina y el colágeno y el tercero los proteoglicanos, moléculas híbridas constituidas por proteínas unidas covalentemente a polisacáridos (Lehninger, 2006).

Las fibrillas que forman la elastina son elásticas por lo que abundan más en los ligamentos, mientras que las del colágeno no tienen esa particularidad y predominan en los tendones. El colágeno, la elastina y los proteoglicanos se producen en los fibroblastos y en los condrocitos, estas proteínas salen por extrusión y se organizan adoptando diversas estructuras de los tejidos conjuntivos (Lehninger, 2006).

3.5. COLÁGENO

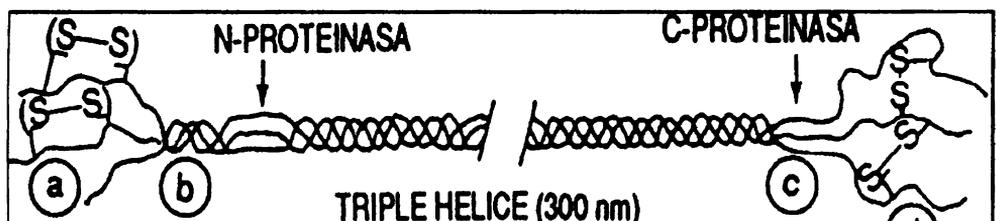
El término colágeno proviene de la palabra griega "Kolla" cuyo significado es gelatina, goma o sustancia de unión (Corrales, 1961). El colágeno es casi la tercer parte de las proteínas totales del cuerpo, siendo la más abundante. Entonces en una vaca de 500 kg de peso vivo, lo que corresponde a colágeno son 167 kg (Lehninger, 2006).

El colágeno está constituido por 35% de glicina, 11% de alanina y el 21% restante de prolina y 4-hidroxiprolina (Lehninger, 2006). Está formado por fibras incoloras con estriación longitudinal, formadas por fibrillas muy finas, uniformes y paralelas, de 0,3 a 0,5 μ de espesor, unidas por una sustancia cementante que al parecer es una proteína que digiere la tripsina. Las fibras de colágeno son flexibles, pero pueden ofrecer gran resistencia a la tracción (Bloom y Fawcett, 1995).

3.5.1. Formación del colágeno

El proceso de formación del colágeno, es idéntico en la formación embrionaria, en un tejido cicatrizal y en un cultivo de tejido. Aparecen delicadas redes de fibrillas ramificadas y anastomosadas sobre la superficie entre los fibroblastos, estas fibrillas pueden seguir los contornos de los cuerpos celulares y sus prolongaciones pero también se extienden dentro de la sustancia intercelular (Bloom y Fawcett, 1995).

El colágeno se constituye en varias etapas; la fase intra-fibroblástica se produce a partir del procolágeno (Fig. 5) y se forman todos los tipos de colágeno. En la fase extra-fibroblástica durante la salida del fibroblasto, las moléculas de procolágeno sufren la acción de dos proteasas cuyo cofactor es el calcio, que rompen los enlaces de los péptidos de extensión, la procolágeno aminopeptidasa libera la porción semihelicoidal y la procolágeno carboxipeptidasa que libera el péptido (Serra, 1983).



AMINOPROPEPTIDO

CARBOXIPROPEPTIDO

Figura 5) Estructura del Procolágeno I. a) Dominio compacto; b) Triple hélice corta (10-12 mm); c) Telopéptido; d) Dominio globular. (Fuente: Serra, 1983)

La molécula que se obtiene es el tropocolágeno que se presenta en forma de bastoncillo rígido constituido por tres cadenas α polipeptídicas enroscadas en una superhélice, en sus extremidades posee unas secuencias polipeptídicas amorfas que se denominan telopéptidos. El tropocolágeno tiene enlaces electrostáticos de hidrógeno e hidrofobos que forman microfibrillas, en éste momento se denomina: colágeno nativo neutro-soluble, porque aún es posible solubilizarlo en una solución salina a pH neutro (Serra, 1983).

En la maduración se forman enlaces covalentes en los telopéptidos que unen las dos cadenas polipeptídicas: los puentes intramoleculares de tipo aldol unen las cadenas α de una misma molécula y los enlaces covalentes intermoleculares forman las fibras de colágeno. En el proceso de maduración se produce la reticulación del colágeno, lo que le da la característica de insoluble a las fibras y pasa a llamarse colágeno nativo fibroso soluble (Serra, 1983).

3.6. TIPOS DE COLÁGENO

El colágeno se clasifica en varios tipos; colágenos mayores, nuevos tipos de colágenos y colágenos menores.

3.6.1. Colágenos mayores

Los colágenos mayores son los clasificados como tipo I, II, III, IV y V. El colágeno tipo I, es la asociación en triple hélice de dos cadenas polipeptídicas idénticas y una cadena genéticamente distinta. Su organización supramolecular es en fibrillas y está presente mayormente en hueso y dentina (Serra, 1983).

El tipo II, es una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas iguales, con estructura supramolecular en fibrillas finas, que abunda en cartílagos, humor vítreo ocular y núcleo pulposo de discos intervertebrales (Cheville, 1994).

El colágeno tipo III es igual al anterior, con residuos de cisteínas que establecen puentes disulfuro en la hélice, su estructura es supramolecular de finas fibrillas que forman una fina red reticular, vasos sanguíneos, piel y tejido de granulación (Cheville, 1994)

El colágeno tipo IV está formado por dos cadenas polipeptídicas diferentes y su composición molecular no ha sido establecida. Tiene zonas colagénicas y no colagénicas, baja cantidad de glicina y está presente en membranas basales de epitelios y endotelios, cápsula de cristalino y membrana de Descemet (Cheville, 1994).

El tipo V, posee tres cadenas polipeptídicas, cuya composición molecular aun no está definida. Tiene una zona no colagénica que promueve enlaces estables, se ubica en la región pericelular asociada a colágeno intersticial, músculo estriado y superficie de fibroblastos (Cheville, 1994).

3.6.2. Nuevos tipos de colágeno

Los colágenos nuevos a su vez se dividen en: colágeno embrionario de tipo I que es un trímero, colágeno tipo VI, "intima colágeno", formado por tres cadenas polipeptídicas diferentes y cadenas cortas conformando una triple hélice de pequeña longitud. El colágeno tipo VII, "LC colágeno", con tres cadenas polipeptídicas LC (long chains) y triple hélice larga y el colágeno tipo VIII o "colágeno endotelial", que posee tres cadenas proteicas EC1, EC2, EC y secuencias no colagénicas (Serra, 1983).

3.6.3. Colágenos menores

Los colágenos menores son el IX y X, el tipo IX es formado por dos fragmentos, HMW y LMW. El HMW (high molecular weight) está compuesto por tres cadenas distintas con puentes disulfuro intercatenario en el centro y el LMW (low molecular weight) también posee tres cadenas diferentes con puentes disulfuro. El colágeno tipo X, tiene en un extremo una parte globular no colagénica, y no posee puentes disulfuro (Serra, 1983).

3.6.4. Enfermedades que afectan colágeno

Las patologías del colágeno generalmente son por deficiencias o anomalías en su conformación o en su maduración. La superproducción de colágeno produce fibrosis y esclerosis (Gazquez, 1991). La fibrosis se establece cuando hay mayor formación de fibras colágenas en tejido conjuntivo por inflamación, cicatrización, atrofia y degeneración (Cheville, 1994).

La deficiencia de tropocolágeno peptidasa en terneros no permite la maduración de las fibras de colágeno produciendo fragilidad en la piel con hiperelasticidad (Gazquez, 1991).

La osteogénesis imperfecta es una patología de origen genético, producida por disminución del colágeno tipo I en los tejidos, en bovinos puede deberse a un efecto heredado en los osteoblastos. Los niveles de osteonectina, proteína la cual debería ser renovada en la mineralización osteoide, está reducida a menos del 10% de lo normal (Jubb y col., 1990).

La dermatosparaxis es una patología hereditaria, por una deficiencia de la enzima peptidasa del tropocolágeno, que se encarga de separar las prolongaciones helicoidales de las terminales amino de las moléculas precursoras de procolágeno, esto conduce a laxitud de la piel, fragilidad de la misma y como consecuencia fácilmente ocurren desgarros (Cheville, 1994).

En la osteodistrofia renal la matriz ósea presenta una limitada afinidad por las sales minerales. La deficiencia de vitamina C afecta todo el tejido conjuntivo. El proceso de depósito de matriz se detiene y los osteoblastos involucionan tornándose indistinguibles de las células progenitoras (Jubb y col., 1990).

La papaína (*Carica papaya*) y otras enzimas proteolíticas de origen vegetal actúan sobre proteoglicanos de la matriz cartilaginosa. La pérdida de glucosaminoglicanos sulfatados va acompañada por disminución de coloración metacromática comparable a la deficiencia de vitamina A, que da rarefacción ósea y degeneración del cartílago (Jubb y col., 1990).

La carencia primaria de cobre, causa a nivel de huesos, osteoporosis por depresión de la actividad osteoblástica, crecimiento de cartílago epifisario aumentado en las uniones costocondrales y huesos metatarsianos, disposición arrosariana de las costillas, agrandamiento de huesos largos y descenso de la formación de colágeno (Radostits, 2002).

El cobre, también interfiere en el entrecruzamiento del colágeno y la elastina, probablemente por una reducción en la lisil-oxidasa, enzima dependiente del cobre (Jubb y col., 1990; Gazquez, 1991).

Existen trastornos del colágeno de causa autoinmune por complejo antígeno anticuerpo, por ejemplo artritis reumatoide o lupus eritematoso canino que es una degeneración fibrinoide del colágeno con aspecto eosinófilo y refringente (Gazquez, 1991).

El complejo granuloma eosinofílico es una hipersensibilidad a insectos, ambiente y alimentos. En equinos este tipo de granuloma produce degeneración, necrobiosis nodular del colágeno y granuloma colagenolítico. Los granulomas se observan como lesiones nodulares, no ulcerativas y sin prurito, pudiendo presentar zona central de color blanco grisáceo, alcanzando a mineralizarse, en zona de montura, central del tronco y cervical lateral (Radostits, 2002).

3.7. ESTUDIO QUÍMICO DE AGENTES LATIRÓGENOS

Para poder identificar los agentes latirógenos está descrita la cromatografía en capa fina (TLC), utilizando ninhidrina como revelador. La ninhidrina es específica para la detección y cuantificación de aminoácidos o derivados de ellos. La cromatografía de intercambio iónico similar a la que se utiliza con aminoácidos normales, permite cuantificar parte de los latirógenos descritos, dando un color verde como ocurre con los agentes osteolatirógenos (Bell 1962, Padmanaban 1980, citados por Valle Vega y Lucas, 2000).

3.8. DIFERENTES PRESENTACIONES DE LATIRISMO

3.8.1. Neurolatirismo

Esta enfermedad es muy antigua, Hipócrates, relata que “la ingestión de ciertas semillas de leguminosas, tenían el poder de causar la parálisis de aquellas personas que las ingerían”. El consumo de las especies de *Lathyrus* como *L. sativus* y *L. cicera* producen esta enfermedad (Spencer, 1995).



Figura 6) Enfermos de latirismo en la India.

Fotografía de Arun Chadha, por cortesía de Sunil Deepak. (Calvo, 2007).

El neurulativismo, ha sido diagnosticado en humanos en Europa, África y Asia (Spencer y col., 1985), siendo en la India un problema existente hasta ahora, por el uso de las semillas de almorta como fuente importante de alimento (Valle Vega y Lucas, 2000).

Esta intoxicación se ha manifestado de forma natural en equinos, bovinos, ovinos y porcinos y se logró su reproducción experimental en monos, con un cuadro similar al observado en humanos (Ludolph y col., 1987) y en bovinos obteniendo un cuadro igual al de brotes naturales (Sugg, 1944).

La enfermedad afecta la parte motora del sistema nervioso central, causando un tipo de paraparesia espástica irreversible, que responde a una degeneración corticoespinal (Spencer, 1995), (Fig 6).

3.8.2. Angiolativismo

Esta intoxicación se describe en animales alimentados con semillas de *L. odoratus* (Valle Vega y Lucas, 2000). El *L. odoratus* contiene beta-aminopropionitrilos tóxicos pero también hay una variedad de nitrilos sintéticos y otros productos en otras plantas que producen similares efectos (Barrow y col, 1974).

El principio responsable de este cuadro es el 4-glutamil-3-aminopropionitrilo, que produce una disminución de la elasticidad de la pared celular de los vasos sanguíneos y aneurisma de la aorta (Valle Vega y Lucas, 2000), en caballos se presentan deformidades en el sistema esquelético y ruptura aórtica (Knight y Walter, 2003).

3.8.3. Osteolativismo

El osteolativismo, también llamado "odorativismo", por ser atribuido al consumo de *Lathyrus odoratus* (Barrow y col., 1974; Valle Vega y Lucas, 2000), es un síndrome de aparición reciente con respecto al neurulativismo (Siebald, 2003).

El latirismo descrito por Gazquez (1991) habla de la intoxicación por *Lathyrus odoratus* que se produce por el incorrecto funcionamiento de la enzima lisil oxidasa provocando la maduración inadecuada del colágeno. Entonces no se permite la transformación de las cadenas laterales lisil en aldehídos, lo que conlleva a la fragilidad del colágeno (Cheville, 1994).

Esto ocurre principalmente en los vasos sanguíneos, como se describió en el angiolatirismo, en el tejido cartilaginoso y óseo produciendo deformaciones del esqueleto, cambios mesodérmicos, neoformaciones, cifoscoliosis y también trastornos neuronales (Gazquez, 1991). Estas lesiones son descritas por Gardner (2009) en una amplia revisión de latirismo experimental.

En ratas alimentadas con una dieta a base de *L. odoratus* los defectos se producen en la formación de periostio y se presentan deformidades obvias de la estructura ósea, como angulación de esternón, exostosis de huesos largos, cifoscoliosis, huesos frágiles que pueden quebrarse, hernias y disección aórtica (Levene, 1966; Fry y col., 1962).

Otras alteraciones histológicas son mencionadas en una revisión de latirismo experimental por Gardner (2009), asociadas al consumo de *L. odoratus* en ratas, donde se describen degeneración articular, afectando cartílagos, cápsula y ligamentos.

Estudios realizados en embriones de pollo evidenciaron una importante pérdida de la resistencia a la tracción en los tejidos mesenquimales por incremento en la solubilidad de componentes del tejido conjuntivo como lo es el colágeno (Levene y Groos, 1959).

Los pollitos tratados con β -aminopropionitrilos muestran angulaciones y movilidad en las articulaciones de las patas (Fry y col., 1962). Además de estas lesiones, en los animales latíricos se presenta fragilidad de tendones y ligamentos (Levene, 1966). Puede haber trastornos teratogénicos que incluyen ectocardia, gastriquisis, paladar hendido y cifoscoliosis efectos que dependen de la dosis y del tiempo de administración (Barrow y col., 1974).

3.9. OSTEOLATIRISMO POR *Lathyrus hirsutus*

Esta forma de intoxicación, asociada al consumo de *L. hirsutus* es la que predomina en el ganado vacuno (Knight y Walter, 2003). Los primeros casos clínicos descritos en bovinos, ocurrieron en Estados Unidos. Los animales afectados eran de diferentes categorías, con edades desde seis meses hasta mayores de ocho años (Sugg y col., 1944).

Los signos clínicos observados en la intoxicación son, salivación, cabeza baja, movimientos continuos de la cabeza y orejas, debilidad, reducción de las respuestas, resistencia a moverse y levantarse, postura en caballete, dolor de las pezuñas con cojeras, posición sentada con los miembros pelvianos por debajo del cuerpo, marcha tambaleante y convulsiones con movimientos de remo (Radostits y col., 2002).

El principal signo clínico observado es la cojera, que aparece a los 3 a 5 días de la ingestión de la planta. En equinos se ven signos similares, con los miembros rígidos, siendo la parálisis del nervio laríngeo un hallazgo recurrente. Experimentalmente se han encontrado problemas reproductivos en pollos y en pollos y suinos cojeras y malformación esquelética (Knight y Walter, 2003).

3.9.1. Evidencia experimental de cuadros de intoxicación por *Lathyrus hirsutus*

En 1922 se realizó un estudio experimental sobre la intoxicación con una planta del mismo género, *Lathyrus clymenum* en Francia. Se sembró la planta y se colocaron animales sanos en dicho potrero. Posteriormente se observaron síntomas clínicos de fiebre, salivación, mucosas congestivas y disnea. Los animales afectados, remitieron completamente los síntomas (Boissiere, 1926).

En un experimento en E.E.U.U., se recolectó *Lathyrus hirsutus* cuando estaba en floración y con vainas. Se almacenó en bolsas, en una habitación fría. Se utilizó un animal de un año de edad, que recibió solo la planta como alimento. Se tomaban parámetros diariamente y hemograma completo, sin verse alteraciones. Al quinto día comenzó con problemas en la estación y en la marcha, empeorando al día siguiente. Al suministrarle otro alimento remitieron los síntomas (Sugg y col., 1944).

En otro experimento, se plantó *L. hirsutus* y *Vicia villosa*, se ingresó un lote de bovinos de 18 a 20 meses de edad a pastorear la plantación. Ganaron peso en invierno y principios de primavera, cuando comenzó a crecer *L. hirsutus*, ninguno de los animales presentó síntomas clínicos de intoxicación. Luego ingresó otro lote de dos años de edad y pasados unos días, uno de los del primer lote y todos los del último lote, enferman mostrando distintos niveles de afección. Todos se recuperaron aun permaneciendo en la pastura (Sugg y col., 1944).

En otro experimento realizado por Sugg y col. (1944), se utilizó *L. hirsutus*, previamente sembrado, cortado en floración, con vainas en formación y administrado en forma de fardo, a dos lotes de animales bovinos. El primer lote, recibió durante 30 días fardos de *Lathyrus*, el segundo lote, recibió el alimento durante 25 días. En ambos lotes no se observaron síntomas de intoxicación (Sugg y col., 1944).

3.10. INTOXICACIÓN NATURAL POR *Lathyrus hirsutus* EN URUGUAY

Durante cuatro años consecutivos a partir del 2004 el Área de Toxicología de Facultad de Veterinaria constató en el mes de noviembre, brotes sospechosos de intoxicación por una planta, *Lathyrus hirsutus*, conocida popularmente como "arvejilla", no registrada hasta el momento como tóxica en Uruguay (Pereira y col., 2007).

En siete brotes estudiados en los departamentos de San José y Canelones (Fig. 7), se afectaron un total de 27 animales, Holando, Normando, Hereford, Limousin y cruza. Se vieron comprometidas principalmente categorías jóvenes. Todos los brotes, ocurrieron en potreros de praderas viejas y campo natural sucio. Se constató una morbilidad de 60% y 0% de mortalidad (García y Santos y col., 2009).

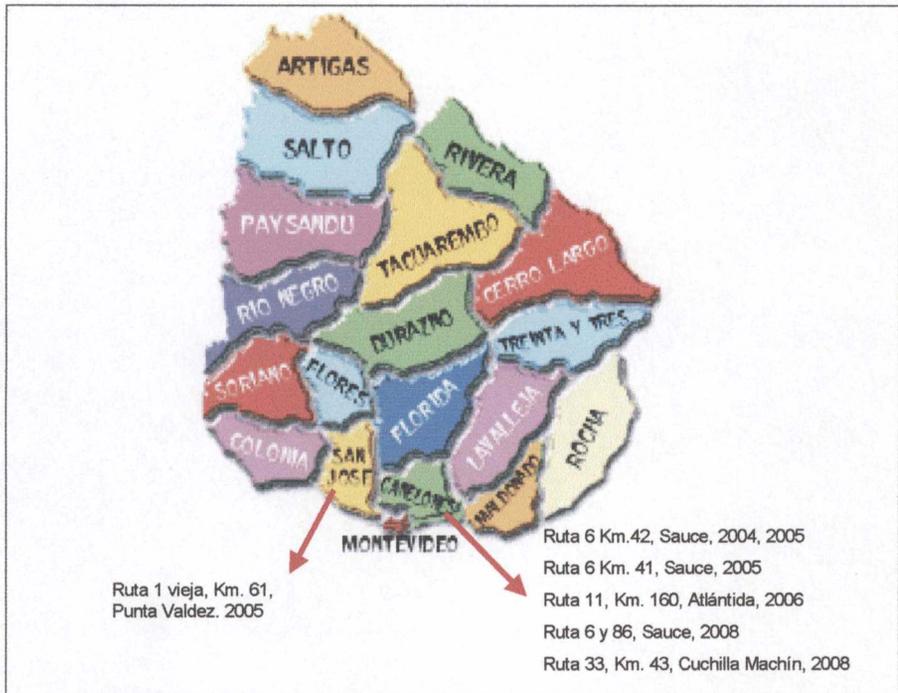


Figura 7) Ubicación de los brotes epidemiológicos en nuestro país.

Entre las manifestaciones clínicas en brotes descritos en el país, se observaron marcha envarada de miembros posteriores y/o anteriores, xifosis e incoordinación. En otro brote, una vaca parida presentó hipogalactia, anorexia y diarrea. Los signos clínicos aparecieron pocos días después de ingresados a los potreros problema (Pereira y col., 2007).

Estos animales enfermos, con dificultades en la marcha y/o decúbito, no lograban una correcta alimentación, llevando a un retraso importante en la ganancia de peso; la vaca recién parida manifestó disminución de la producción de leche (Pereira y col., 2007).

Si bien todos los animales enfermos, al ser retirados de los potreros problema, se recuperaron, fueron evidenciadas pérdidas significativas en la producción (Pereira y col., 2007). El diagnóstico de la intoxicación se realizó en base a los datos epidemiológicos, presencia de la planta en los predios problema y signos clínicos manifestados (García y Santos y col., 2009).

4. HIPÓTESIS

La planta identificada como *Lathyrus hirsutus* es responsable de los brotes naturales de enfermedad en bovinos.

El cuadro clínico de la intoxicación espontánea es similar al de la intoxicación experimental por *L. hirsutus*.

El principio tóxico latirogénico está presente en las plantas de *L. hirsutus* de nuestro país.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la intoxicación por *Lathyrus hirsutus* en bovinos.

5.2. Objetivos específicos

1. Comprobar experimentalmente la intoxicación por *Lathyrus hirsutus* en terneros.
2. Determinar cual es la parte de la planta de *L. hirsutus* que tiene en mayor concentración el principio tóxico.
3. Caracterizar el cuadro clínico-patológico mediante el consumo inducido de *L. hirsutus*.
4. Identificar químicamente el agente responsable de los efectos tóxicos en *L. hirsutus*.
5. Caracterizar botánicamente, mediante análisis microhistológico, las epidermis de la planta, como una herramienta diagnóstica más en los brotes naturales de intoxicación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la intoxicación experimental por *L. hirsutus* en terneros, se realizaron dos experimentos. El primero, administrando la planta verde y fresca, vía oral, de acuerdo a Tokarnia y col. (2000), que define planta tóxica aquella que además es probada experimentalmente bajo estas condiciones.

Como en este primer experimento no se logró cumplir con el objetivo mencionado, se procedió a realizar un segundo experimento, administrando las vainas y semillas secas y molidas, que de acuerdo a la bibliografía son las partes más tóxicas de esta planta (Barceloux, 2008). En el segundo experimento, se logró el objetivo de la intoxicación experimental, en un solo ternero, por lo que se repitió el diseño con otro animal, reafirmando los resultados.

6.1. Experimento I

El primer experimento se realizó en el Campo Experimental N°2 de Libertad, Ruta 1, km 42, departamento de San José, desde el 13 de noviembre hasta el 13 de diciembre del año 2006.

6.1.1. Instalaciones

Se utilizó un corral techado, con comederos y bebederos individuales, perfectamente aislados del resto de los animales del establecimiento (Fig. 8).



Figura 8) Infraestructura donde se llevó a cabo el Experimento I.

6.1.2. Recolección de la planta

La colecta de la planta se llevó a cabo semanalmente durante el mes de noviembre de 2006, en el Establecimiento “El Orejano”, ubicado en el paraje de Punta Valdez, Ruta 1 vieja, Km 61, departamento de San José (Fig. 9). En dicho establecimiento, el año anterior, en el mes de noviembre, se habían manifestado cuadros clínicos atribuibles al consumo de *Lathyrus hirsutus*. La colecta se realizó en las primeras horas del día, cortando tallos, hojas, flores y frutos de la planta, colocándose en bolsas de plastillera.



Figura 9) Colecta de *Lathyrus hirsutus*, Establecimiento “El Orejano” San José.

6.1.3. Conservación y procesamiento de la planta

La planta entera fue almacenada en freezer (frío húmedo) (Fig. 10), un día antes se retiraba la dosis diaria para cada animal para que se descongelara a temperatura ambiente. Luego se pesaba en balanza de precisión la dosis correspondiente administrada a cada uno de los terneros.



Figura 10) Almacenamiento de la planta colectada.

6.1.4. Selección de animales

Se utilizaron un total de cuatro terneros, mayores de tres meses de edad que fueron pesados e identificados de la siguiente manera:

Nº de caravana	Peso Inicial (Kg)	Raza	Dosis administrada (%) y (Kg/día)	Peso Final (Kg)
119	108	Cruza Jersey	1% - 1,08	120
121	91	Cruza Jersey	2% - 1,82	97
122	71	Holando	3% - 2,13	78
120	113	Cruza Jersey	Testigo	119

Cuadro I: Animales de Experimento I

Los animales seleccionados fueron desparasitados previamente al inicio del ensayo y estaban vacunados contra Fiebre Aftosa, Clostridiosis y Neumoenteritis. Uno de los animales se eligió como testigo y los otros tres se utilizaron para la experimentación.

6.1.5. Metodología

Previo al inicio y semanalmente durante la experimentación, se extrajo sangre de vena coccígea a los animales, para realizar hemograma completo y medir los valores de calcio y fósforo. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis clínicos de Facultad de la Veterinaria.

Se realizó Examen Objetivo General, con énfasis en actitudes, postura y marcha, diariamente desde el inicio hasta finalizar el ensayo.

6.1.6. Cantidad y forma de administración de *Lathyrus hirsutus*

Los animales seleccionados, recibieron un ayuno de sólidos de 12 horas, con agua *ad libitum* antes de la experimentación. El animal elegido como testigo, fue a pradera para pastoreo de buena calidad y agua *ad libitum*.

Los terneros elegidos para recibir la planta, consumieron las partes aéreas de *L. hirsutus*. El ternero N° 119, de 108 kg de peso corporal, recibió el 1% de su peso vivo, lo que equivale a 1,08 kg/día de planta. El ternero N° 121, de 91 kg de peso vivo, recibió un 2% de su peso, equivalente a 1,82 Kg/día. El N° 122, de 71 kg/peso vivo, recibió un 3% de su peso, equivalente a 2,13 Kg/día.

El ternero 119 y el 121, complementaron su dieta con forraje de buena calidad. El ternero 122 (Fig. 11) solamente recibió la planta problema y el ternero N° 120 utilizado como testigo, fue a pradera.

La dosis de planta administrada diariamente era dividida en dos partes iguales, una parte se les daba en las primeras horas del día y la otra en las primeras horas de la tarde.



Figura 11) Ternero N° 122 alimentándose de la planta.

6.2. Experimento II

Este experimento, se realizó en el predio de la sede central de la Facultad de Veterinaria, Av. Lasplaces 1550, Montevideo. La experimentación se llevó a cabo en dos etapas, desde el 10 al 23 de abril del año 2008 y la segunda etapa desde el 28 de agosto hasta el 10 de setiembre de 2009.

6.2.1 Instalaciones

Se utilizaron dos boxes pertenecientes al Hospital de Facultad de Veterinaria. Los boxes, comederos y bebederos, fueron higienizados con desinfectante y agua potable, antes del ingreso de los animales.

6.2.2 Recolección de la planta

Para las dos etapas de este experimento, la planta se obtuvo en noviembre de 2007, en uno de los predios problema de la localidad de Sauce, Ruta 6, Km 42, Canelones (Fig. 12). Se procedió a tomar la parte aérea de la planta, para ser embolsada y transportada al Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria, Montevideo, para ser procesada.



Figura 12) Colecta de *L. hirsutus* para Experimento II.

6.2.3 Procesamiento de *Lathyrus hirsutus*

La planta se colocó sobre papel de embalaje extendido sobre una superficie seca, fue dada vuelta dos veces por día para que se orea y de ésta manera facilitar su secado (Fig. 13).

Luego de su secado, se realizó la separación del fruto (vainas y semillas) manualmente (Fig. 13), se envolvió en papel de embalaje y se secó en estufa, para después molerlo y almacenarlo.



Figura 13) Planta colectada para su posterior procesamiento.



Figura 14) Vainas separadas para su secado.

El secado fue realizado en estufa marca Elektro-Helios, a 60° C por un lapso de seis horas. Luego del secado se procedió al molido, utilizando una licuadora de alta potencia durante 5 minutos por cada fracción de chauchas, hasta obtener una molienda homogénea. La planta molida era sometida a dos horas más de estufa a 60° C y luego para su óptima conservación, se almacenó en bolsas de papel, en lugar seco y aireado, perfectamente identificadas con el peso de la molienda que contenían.

6.2.4. Selección de animales

Se utilizaron un total de cuatro animales procedentes del Campo Experimental N° 2 de Libertad, mayores de cinco meses de edad. Dos terneros fueron utilizados para el experimento y dos como testigos. Fueron identificados como: Ternero 1, utilizado en la primer etapa, macho, cruce Holando, con un peso de 109 kg. El Ternero 2, segunda etapa, macho, raza Holando, con un peso de 107 kg. Se utilizaron dos terneros testigos (T1 y T2), de edades similares a los experimentales, machos, de raza Holando, de 110 (T1) y 115 kg (T2).

Identificación	Peso (Kg)	Raza	Dosis administrada (%)y (Kg/día)
Ternero 1	109	Cruza Holando	0,9%/PV – 0,96
Ternero 2	107	Holando	0,9%/PV – 0,98
Ternero T1	110	Holando	Testigo
Ternero T2	115	Holando	Testigo

Cuadro II: Animales de Experimento II

Todos los terneros, fueron desparasitados con Albendazol previo análisis coprológico, antes del ingreso a la Facultad de Veterinaria. Fueron alimentados con fardos de alfalfa, ración para terneros de tambo, consumiendo 2 kg por día y pastoreo para mejorar su estado antes de comenzar con la experiencia.

Previo al comienzo de la experimentación los animales se analizaron clínicamente, se les realizó un Examen Objetivo General, poniendo mayor atención en actitudes, postura y marcha, hemograma completo (se tomo la muestra de la vena coccígea), realizado en el Laboratorio de Facultad de Veterinaria. Recibieron ayuno de sólidos de 12 horas con agua *ad libitum* antes del inicio del experimento.

6.2.5. Cantidad y forma de administración de *L. hirsutus*

A los dos terneros experimentales, se les administró la molienda de vainas con semillas, en dosis equivalentes al 0,9% de peso vivo y agua *ad libitum*. Este porcentaje se calculó teniendo en cuenta que, según Calvo (2007), las plantas del género *Lathyrus* para producir intoxicación deben encontrarse en porcentajes superiores al 30% de la dieta. Sabiendo que los bovinos consumen un 3% de materia seca de su peso vivo por día, el 30% del 3% de la dieta sería 0,9% del peso.

El ternero 1 recibió 0,98 kg/día y el ternero 2, 0,96 kg/día de molienda de planta, en las primeras horas del día, completando la dieta con forraje y otros suplementos. Los testigos recibieron fardos de alfalfa, ración, pastoreo y agua *ad libitum*.

6.2.6. Eutanasias y necropsias

Luego de tomar los registros pertinentes para evidenciar la sintomatología, se procedió a realizar la eutanasia de los animales del experimento II, con xilazina al 2% intramuscular y luego se colocó catéter intravenoso en la vena yugular para proceder a la administración de tiopentona al 10%, de acuerdo a los lineamientos de la Comisión de Bioética de Facultad de Veterinaria.

Se realizaron las necropsias y se registraron fotográficamente imágenes de las cavidades y órganos. Se tomaron muestras de hígado, corazón, riñones, adrenales, tráquea, pulmones, bazo, esófago, duodeno, yeyuno, ganglios linfáticos mesentéricos, aorta, cartílago articular, músculo, hueso y encéfalo. Específicamente se tomaron muestras de tendones: flexor digital superficial, profundo y lateral y extensor del dedo, de los cuatro miembros.

El material se fijó con formol bufferado al 10% y se envió al Laboratorio de Patología de Facultad de Veterinaria y al DILAVE de Paysandú. A su vez, muestras de aorta, tendones, huesos y músculos, se fijaron en glutaraldehído al 2 y 4% y se remitieron al Laboratorio Regional de Diagnóstico de la Universidad Federal de Pelotas, Río Grande del Sur, Brasil, para su estudio ultraestructural.

6.3. Análisis microhistológico para la identificación de la epidermis de *Lathyrus hirsutus*

El análisis microhistológico, se realizó en el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria, por raspaje con hoja de bisturí de una hoja de *Lathyrus hirsutus* y se observó su epidermis sobre un porta objeto con glicerina, en microscopio con un aumento de x40. En el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Química, se realizó un diafanizado, colocando la hoja de la planta, en un tubo de ensayo, con hidrato de cloral, se llevó a baño María unos minutos, luego se extendió la muestra en un portaobjeto y se observó al microscopio, x40.

6.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

El estudio se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Química, partiendo de los extractos (acuosos, etanólico y clorofórmico) de *Lathyrus hirsutus*. Se utilizaron placas Polygram ® SIL G/ uv 254 marca Macherey-Nagel, fase móvil cloroformo y la ninhidrina como revelador.

7. RESULTADOS

Experimento I

Los animales utilizados en esta experiencia no presentaron alteraciones al examen objetivo general. De igual forma los análisis clínicos realizados, tampoco revelaron datos importantes. No se realizó necropsia de estos animales.

Experimento II

Los animales que fueron utilizados en a Experiencia II, presentaron alteraciones en la marcha, postura y actitudes. En los análisis clínicos no se encontraron valores fuera de los parámetros normales.

Clínicamente el Ternero 1, manifestó síntomas clínicos más evidentes a los 9 días y el Ternero 2 a los 7 días de comenzada la experimentación. El Ternero 1, presentó al día 7, postura anómala, astasia, ataxia y pérdida de estabilidad.



Figura 15) Tracción pasiva y excesiva de miembros pelvianos,

Ternero 1.

Al examen particular del aparato locomotor, los miembros pelvianos se podían traccionar pasivamente hacia atrás en forma excesiva (Fig. 15) y no se encontraron signos de inflamación a nivel articular. Las articulaciones tarsianas permanecían juntas en la estación (Fig. 16).

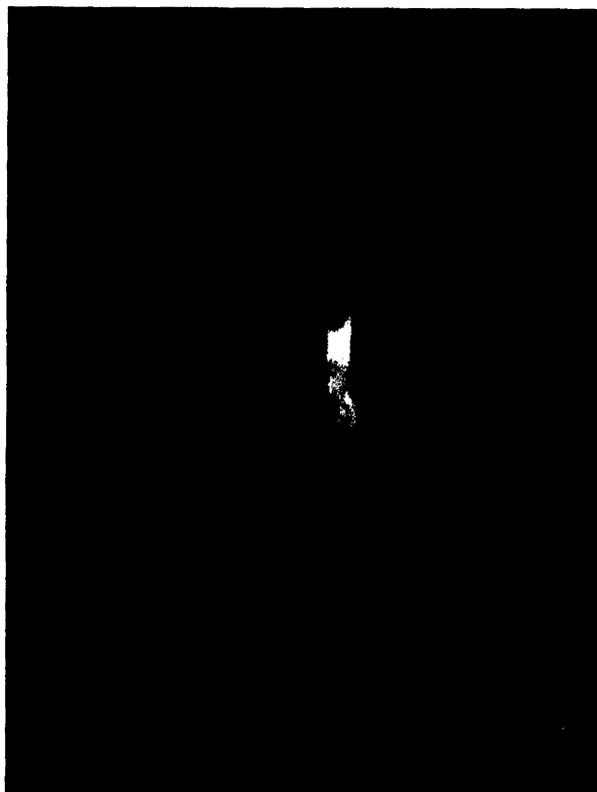


Figura 16) Fotografía que muestra posición de los garrones, Ternero 1.

Este animal al día 10, se rehusaba a caminar, permaneciendo la mayoría del tiempo en decúbito esternal y solo se levantaba si era ayudado. Al 11º día, no se levantó más. Se sacrificó al día 14 de comenzada la experiencia.

El Ternero 2 presentó, astasia, ataxia, andar rígido, principalmente de miembros posteriores, lumbalgia y dolor articular a nivel de tarso y de articulación metatarso-falangiana. Fue sacrificado al día noveno de la experimentación, antes de llegar al decúbito.

En las necropsias realizadas en los terneros, no se observaron alteraciones importantes, solo el ternero 1 presentaba a nivel de articulación coxofemoral líquido sinovial en mayor cantidad (Fig. 17).

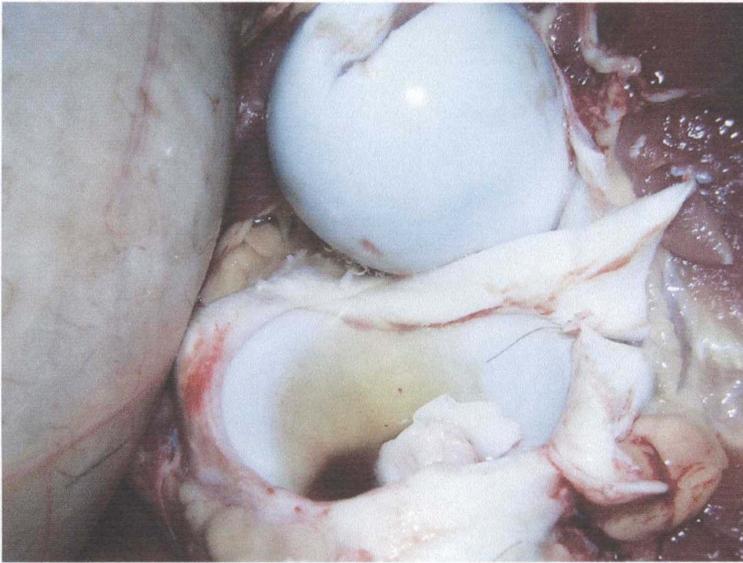


Figura 17) Articulación coxofemoral derecha, Ternero 1.

Resultados de histopatología

En los tejidos tomados de rutina para histopatología no se visualizaron alteraciones significativas. Si se observó en el tendón flexor digital superficial del ternero 1, degeneración, vacuolización, infiltrado inflamatorio, con pérdida de la trama del tejido (Fig 18, a y b).

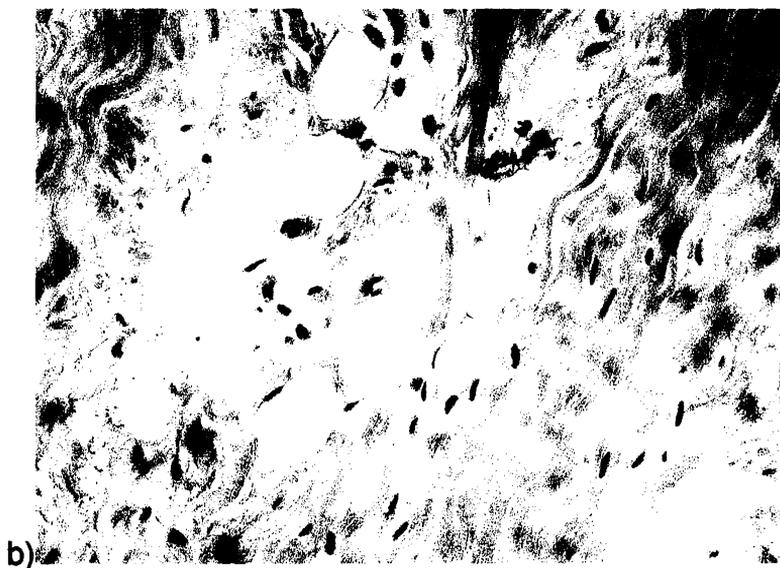
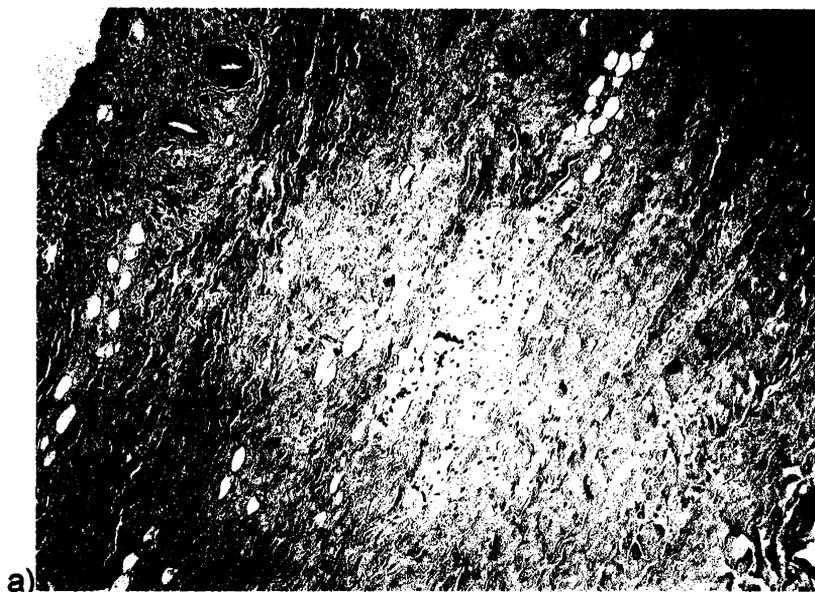


Figura 18) a) Flexor superior, Ternero 1, vista panorámica, se observan gran cantidad de vacuolas e infiltrado inflamatorio, b) Mismo tejido a mayor aumento.

RESULTADOS DE HISTOPATOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL

Fueron procesadas para microscopía electrónica únicamente las muestras de tendón. En el ternero 1, no aparecieron alteraciones ultraestructurales. Las muestras de tendón flexor superficial y extensor digital lateral del ternero 2, se encuentran en estudio.

Resultados de estudios químicos

En la cromatografía en capa fina (TLC), el extracto de etanol 96%-agua (7:3), con la ninhidrina reveló una mancha azul-verdosa inestable, que podría tener varios compuestos (Fig 19).

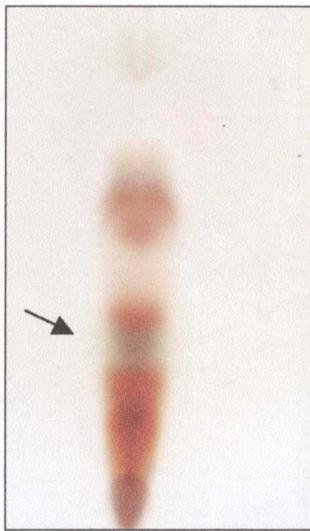


Figura 19) TLC de *Lathyrus hirsutus* (2009).

Identificación botánica de la planta sospechosa

Muestras de la planta recolectada en los lugares donde ocurrieron los brotes naturales fueron clasificadas en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química, como *Lathyrus hirsutus* L. La misma fue ingresada al herbario MVFQ, acompañada de los siguientes datos, *Lathyrus hirsutus* L. Uruguay, Departamento de Canelones, Sauce, Ruta 6, kilómetro 36. Noviembre de 2008. Leg. Cecilia Franco & Gabriela Moreira s/n. (MVFQ N° 4339). Ésta clasificación se realiza por comparación directa con ejemplares del herbario de Facultad de Química.

Resultados del análisis microhistológico



Figura 20) Fotografía de análisis microhistológico, método directo,
Laboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria (2006).



Figura 21) Fotografía de análisis microhistológico, por diafanizado,
Botánica, Facultad de Química (2010)

La epidermis de *Lathyrus hirsutus* L. presenta células de bordes sinuosos, estomas de 16 micrones de largo, ranunculáceos o anomocíticos (sin células acompañantes) y en su cara abaxial cutícula estriada (Fig. 21). Contra las nervaduras posee cristales de oxalato de calcio que son producto de secreciones, de 12 micrones de largo (Fig. 22).

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo comprobaron que *Lathyrus hirsutus* es tóxica para bovinos. De esta manera confirmamos que los brotes espontáneos ocurridos en Canelones y San José, fueron producidos por la ingestión de esta planta.

En el experimento I no se pudo comprobar la toxicidad de *Lathyrus hirsutus* puesto que los animales no manifestaron la sintomatología clínica esperada. Esto pudo deberse a que se administraron todas las partes aéreas de la planta y que las mismas fueron colectadas cuando las vainas no habían alcanzado su pleno desarrollo. En experiencias realizadas por otros autores, apreciaron períodos en el ciclo de estas plantas, en los cuales no resultan tóxicas (Sugg y col., 1944).

Según Barceloux (2008), las vainas y semillas son las partes más tóxicas de *Lathyrus*. De acuerdo a las observaciones de los brotes naturales, en donde las semillas aparecían en la materia fecal de los animales intoxicados, se podría pensar en las vainas como la parte más tóxica, ya que los animales digerían toda la planta, menos las semillas. Estas observaciones coinciden con lo sugerido por Sugg y col. (1944), de que las semillas maduras salen de las vainas y éstas últimas serían la parte más tóxica de la planta.

Los 3 terneros que recibieron la planta, durante un mes, aumentaron su peso entre 6 y 12 kg. En el mismo período, el testigo que recibía forraje de buena calidad, aumentó 6 kg. Este aumento de peso, también fue observado por Sugg y col. (1944) en una de sus experiencias con esta planta.

El género *Lathyrus*, por su alto contenido proteico y de carbohidratos, es utilizado en la dieta humana y animal (Spencer y col., 1985) y en el sur de E.E.U.U, California y Oregon, *L. hirsutus* es utilizado como leguminosa anual de invierno para la alimentación del ganado (Beasley, 1999).

En ninguno de los dos experimentos se encontraron cambios en los valores de hemogramas, calcemia y fosfatemia de los terneros. En los

experimentos realizados por Sugg y col. (1944), tampoco fueron encontrados valores sanguíneos alterados.

En el segundo experimento, se constató la toxicidad de la planta en estudio. En esta, fueron utilizadas vainas y semillas de *L. hirsutus*, secadas en estufa y molidas. Las partes administradas, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, son las que contienen mayor concentración de los principios tóxicos (Barceloux, 2008).

La planta utilizada para realizar el experimento II, fue colectada a fines del mes de noviembre, en floración y con vainas maduras. En esta misma época se describen los brotes naturales de intoxicación (Pereira y col., 2007; García y Santos y col., 2009).

De acuerdo a Calvo (2007), los efectos tóxicos en humanos por ingestión de vainas de plantas del género *Lathyrus*, se manifiestan cuando estas alcanzan más del 30% de la dieta. Es por eso que las dosis administradas en estas etapas del trabajo, fueron de 0,9% del peso total.

Las observaciones realizadas en este experimento, nos permiten afirmar que la toxicidad de *L. hirsutus*, se mantiene luego del secado a temperatura de 60° C y por un período superior a veinte meses, ya que fue el tiempo transcurrido entre el secado de la misma y la segunda etapa del experimento. La literatura consultada menciona la estabilidad del principio tóxico de la planta a altas temperaturas (Lewis y col., 1948).

Los animales que recibieron *L. hirsutus* en el experimento II, presentaron manifestaciones clínicas características del cuadro de osteolatrismo (Radostits y col., 2002), similares a las observadas en intoxicaciones naturales (Pereira y col., 2007) y a lo estudiado experimentalmente (Sugg y col., 1944).

En el ternero 1 los síntomas clínicos de intoxicación se evidenciaron al 9° día y en el segundo al 7° día del inicio del experimento. Según Sugg y col. (1944), en una de sus experiencias, la evolución clínica fue más aguda, en un animal que solo se alimentó de *L. hirsutus*, apareciendo al 5° día.

Al examen clínico particular de los terneros experimentales, los signos más relevantes fueron observados en la postura y en la marcha, no presentando cambios de conducta ni actitudes. Al examen particular de las articulaciones de los miembros en uno de los terneros no se observaron signos de inflamación y el otro presentó dolor lumbar y en las articulaciones del tarso y metatarso-falangianas.

En los hallazgos de necropsia no se observaron lesiones relevantes. En el ternero 1, hubo aumento del líquido sinovial en la articulación coxofemoral, esto podría deberse al cuadro de intoxicación o más probablemente al decúbito en el que permaneció este animal previo a la eutanasia.

Las alteraciones histológicas observadas en el tendón flexor superficial del ternero 1, de degeneración, vacuolización, infiltrado inflamatorio y pérdida de la trama, sugerirían el efecto tóxico de un agente latirogénico. Otras lesiones microscópicas, asociadas al consumo de *L. odoratus* en ratas, citadas por Gardner (2009) son similares, presentando degeneración articular, afectando cartílagos, cápsula y ligamentos.

Las características observadas en las epidermis de hojas de *L. hirsutus*, mediante la técnica del análisis microhistológico, pueden ser utilizadas como una herramienta para el diagnóstico en intoxicaciones espontáneas por esta planta. Esta técnica ha sido probada con este objetivo en otras experiencias (Panter y col., 1987; Yagueduú y col., 1998; Yagueduú y col., 2000; García y Santos y col., 2004).

Los estudios químicos para identificar el principio activo de *L. hirsutus*, realizados en nuestro trabajo, mostraron una mancha azul-verdosa inestable. La identificación de los latirógenos citada en la literatura (Padmanaban, 1980; Bell, 1962, citados por Valle Vega y Lucas, 2000) mencionan una mancha color verde característica de los aminoácidos o sus derivados. Para poder afirmar la presencia del aminoácido no proteico β -aminopropionitrilo en nuestros extractos, debería purificarse más la muestra, intentando una mancha estable verde o realizar alguna otra técnica como HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) para identificar el principio activo.

9. CONCLUSIONES

- Se comprobó experimentalmente que la planta *Lathyrus hirsutus* es tóxica para bovinos en el Uruguay, confirmándola como responsable de los brotes naturales de enfermedad.

- Basados en nuestros resultados patológicos y químicos, podemos decir que el diagnóstico de la intoxicación por *L. hirsutus* es epidemiológico y clínico.

- En las condiciones de nuestro trabajo, resultaron tóxicas las vainas y semillas molidas de *L. hirsutus*, colectadas a fines de noviembre, época en que ocurre la intoxicación espontánea.

- La sintomatología clínica experimental es idéntica a la manifestada en brotes naturales.

- Las lesiones histológicas fueron encontradas a nivel del tejido conjuntivo tendinoso.

- Luego del procedimiento de secado, molido y almacenamiento, *Lathyrus hirsutus* mantiene su toxicidad durante veinte meses de acuerdo al tiempo entre la cosecha y el último experimento.

- Los animales alimentados con *Lathyrus hirsutus*, previo a la floración y maduración de las vainas, ganan peso.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arruti, F., Ferrés, J., Trelles, M. (2007). Intoxicación experimental por Roble (*Quercus spp.*) en bovinos. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Uruguay. 32 p.
2. Barrow, M., Simpson, C., Miller, E. (1974). Lathyrism: A Review Quart. Rev. Biol., 49 (2):101-128.
3. Beasley, V. (1999). Toxicants that Cause Paresis or Paralysis Veterinary Toxicology, International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. Disponible en www.ivis.org Fecha de consulta: 10/07/10.
4. Barceloux, D. G. (2008). Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals, New York, John Wiley. 1158 p.
5. Boisseère, P. M. (1926). Contribution à l'étude du Lathyrisme chez les Bovins. These Ec. Nat. Vet. D'Alfort N° 100, 50 p.
6. Bloom Fawcett, W. (1995). Tejido conjuntivo en Tratado de Histología. 12ª ed. Interamericana. McGraw-Hill, 1094 p.
7. Bruneton, J. (2001). Fabales (Leguminosas). En: Bruneton, J. Plantas tóxicas, Vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Zaragoza, Acribia. p 269-301.
8. Calvo, M. (2007). Bioquímica de los Alimentos. Latirismo y Fabales. Disponible en <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/latirismo.html> Fecha de consulta: 10/07/10.
9. Cheville, N. F. (1994). Sustancias extracelulares. En Cheville, N. F. Introducción a la Anatomía Patológica General Veterinaria. Zaragoza, Acribia. p 135-150.
10. Corrales, H. (1961). Concepto General de las Enfermedades del Colágeno o Colagenosis. Rev. Med. Hond. Vol. 29. Disponible en www.bvs.hn/RMH/pdf/1961/pdf/Vol29-1-1961-5.pdf Fecha de consulta: 10/07/10.
11. MGAP. DIEA (2009). Anuario estadístico agropecuario 2009. DIEA. pp. 39. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Anuario2009/pages/a-indice.html> Fecha de consulta: 13/08/09.

12. Dusi J. L. (1949). Methods for the determination of food habits by plants microtechniques and histology and their application to cottontail rabbit food habits. *J. Wild. Manag.* 13:295-298
13. Etcheberry, G., Goyen, J., Pereira, R. (2008). Intoxicación por *Nierembergia rivularis* en ovinos del Uruguay. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Uruguay. 60 p.
14. Fry, P., Harkness, M., Harkness, R., Nightingale, M. (1962). Mechanical Properties of Tissues of Lathyrific Animals, *J. Physiol.*, 164:77-89.
15. Ferreira, S., Fumero, R. (2008). Investigación sobre la toxicidad de *Senecio madarascariensis* en bovinos. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Uruguay. 57 p.
16. García y Santos, C., Verdes, J. M., Moraña, A., Gutiérrez, F., Battes, D., Capelli, A., Bartolomé, J. (2004). Microhistological analysis of *Solanum bonariense* L. epidermis as diagnostic method during experimental intoxication in calves. *Pesq. Vet. Bras.* 24 (1): 24-25.
17. García y Santos, C., Sosa, S., Capelli, A., Pérez, W., Domínguez, R., Aldecoa, C., Franco, C., Moreira, G. (2009). Osteolathyrism in Calves in Uruguay. 8th International Symposium on poisonous plants. May 4-8; Joao Pessoa, Paraiba, Brazil. p 77.
18. Gardner, A. (2009). Experimental Lathyrism, review of the literature. Disponible en: www.ajcn.org/cgi/reprint/7/2/213.pdf Fecha de consulta: 25/08/10.
19. Gazquéz, A. (1991). Patología Veterinaria. Madrid. Interamericana. McGraw-Hill. 501 p.
20. Haque, A., Hossain, M., Wouters, G., Lamboin, F. (1996). Epidermiological Study of Lathyrism in Northwestern Districts of Bangladesh. *Neuroepidemiology*, 15 (2):83-91.
21. Holechek, J. L., Vavra, M., Pieper, R. D. (1982). Botanical composition determination of range herbivore diets: a review. *J. Wild. Manag.* 35: 309-315.
22. Izaguirre, P., Beyhaut, R. (1998). Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas, Hemisferio Sur, Montevideo. 550 p.
23. Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., Palmer, N. (1990). Patología de los animales domésticos. 3ª ed. New York. Hemisferio Sur. 573 p.

24. Knight, A. P., Walter, R. G. (2003). Plant affecting the nervous system (Part III). En: A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America. Disponible en: http://www.ivis.org/special_books/Knight/chap6b/ivis.pdf Fecha de consulta: 27/07/10.
25. Lehninger, A. (2006). Principios de Bioquímica, 4ª Ed, Barcelona, Omega, 1119 p.
26. Levene, C. I. (1966). Collagen and lathyrism, Proc R Soc Med. 59(8):757–758. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1901170/ Fecha de consulta: 25/08/10.
27. Levene, Ch., Gross, J. (1959) Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by α -aminopropionitrile (Lathyrus factor), Massachusetts. J. Exp. Med. 110(5): 771–790.
28. Lewis, Howard, B., Stine Fajans, R., Burt Esterer, M., Shen, C., Oliphant, M. (1948). The Nutritive Value of Some Legumes. Lathyrism in the Rat. The Sweet Pea (*Lathyrus Odoratus*), *Lathyrus Sativus*, *Lathyrus Cicera* and Some Other Species of *Lathyrus*. Disponible en: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/36/5/537> Fecha de consulta: 27/07/10.
29. Lombardo, A., Muñoz, J. E. (1980). Plantas Trepadoras. Montevideo, IMM. 111 p.
30. Lombardo, A. (1982). Flora Montevidensis tomo I. Montevideo, IMM. 316 p.
31. Ludolph, A. C., Hugon, J., Dwivedi, M. P., Schaumburg, H. H., Spencer, P. S. (1987). Studies on the aetiology and pathogenesis of motor neuron diseases. Brain 110: 149-165.
32. Monroy, I., Preliasco, M., (2008). Investigación sobre la toxicidad de *Senecio grisebachii* en bovinos del Uruguay. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Uruguay. 65 p.
33. Mosjidis, J. A., Owsley, C. M. (2002). Legume cover crop development by NRCS and Auburn University. Making conservation tillage conventional: building a future on 25 years of research. Proceedings of 25th Annual Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture, Auburn, EEUU. p 305-309.
34. Panter, K. E., Ralph, M. H., Smart, R. A. & Duellke, B. (1987). Death camas poisoning in sheep; A case report. Vet. Hum. Toxicol. 29 (1): 45-48.

35. Pereira, R., Capelli, A., Domínguez, R., Arago, S., Pérez, W., Alonso, E., García y Santos, C. (2007). Intoxicación Espontánea por *Lathyrus hirsutus* en terneros del Uruguay. V^{as} Jornadas Técnicas Veterinaria, Universidad de la República, 21, 22 y 23 de Noviembre de 2007. Montevideo Uruguay, p 74.
36. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. (2002). Medicina Veterinaria: Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. II. 9^a Ed. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana, 1008 pp.
37. Riet-Correa, F., Méndez, M.C. (1993). Introdução ao estudo das plantas tóxicas. En: Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Riet-Correa, F., Méndez, M.C., Schild, A.L. Montevideo, Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur, 340p.
38. Rivero, R., Matto, C., Dutra, F., Riet-Correa, F. (2009). Toxic Plants Affecting Cattle and Sheep in Uruguay. 8th International Symposium on poisonous plants. May 4-8; Joao Pessoa, Paraiba, Brazil. p 1.
39. Riet-Correa, F., Medeiros, R. M. T. (2000). Toxic plants for ruminants in Brazil and Uruguay: economic impact, control measures and public health implications. XXI World Buiatric Congress, Punta del Este, Uruguay. p11.
40. Riet-Correa, F., Medeiros, R. M. T. (2001). Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. Pesq. Vet. Bras. 21 (1): 38-41.
41. Serra Baldrich, N. (1983). Colaboraciones. Revisiones clínicas y estudios terapéuticos. El colágeno (Farmacéutica). Barcelona. Actualidades dermatológicas. p 183-192. Disponible en www.actualidaddermatol.com/art3394.pdf Fecha de consulta 13/08/09.
42. Siebald, M. (2003). Latirismo. Cuadernos de Neurología, XXVII, Pontificia Universidad Católica de Chile. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/2004/Latirismo.html> Fecha de consulta 23/07/10.
43. Spencer, P. S. (1995). Lathyrism. Handbook Clinic. Neurol. 21(65):1-20.
44. Spencer, P. S., Roy D. N., Palmer V. S., Dwivedi M. P. (1985). *Lathyrus sativus* L: The need of strain lacking human and animal neurotoxic properties. *Lathyrus* and lathyrism: proc of the int symposium/ sponsored by

- the Inst de biocenotique experimentale des agrosystemes (IBEAS), Univ de Paul et des pays de l'Adour, 9-13 Sept 1985. Editors A.K. Kaul and D. Combes. New York: Third World Medical Research Foundation. p 297-305.
45. Strong, F. M. (1966). Naturally Occurring Toxic Factors in Plants and Animals Used as Food. p 568-573. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1935363/pdf/canmedaj01156-0003.pdf> Fecha de consulta 07/09/10.
 46. Sugg, S., Simms, B. T., Baker, K. G. (1944).. Studies of toxicity of wild winter Peas (*Lathyrus hirsutus*) for Cattle. Vet. Med. 39: 308-310.
 47. Tokarnia, Ch., Doböreiner, J., Peixoto, P. V. (2000). Plantas Tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro, Heliantos, 310 p.
 48. Valle Vega, P., Lucas Florentino, B. (2000). Toxicología de los Alimentos. p. 104-107. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/30700594/Toxicologia-de-Alimentos-2000-Vega-Florentino> Fecha de consulta 23/07 /10.
 49. Yagueduú, C., Cid, M. S., López, T. (1998). Microhistological analysis of sheep gastro-intestinal content to confirm poisonous plant ingestion. J. Range Manag. 51: 655-660.
 50. Yagueduú, C., Cid, M. S., López, T., Brizuela, M. A. (2000). Exactitud y precisión en la cuantificación por microanálisis de *Cestrum parqui* L'Hérit en el contenido digestivo de ovinos en pastoreo. Vet. Arg. 17(170):757-767.