



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA



**“INTOXICACIÓN EXPERIMENTAL POR *Euploca ocellata* (Cham.) EN OVINOS
Y SU ASOCIACIÓN CON LA COLANGIOPATÍA ASOCIADA A CRISTALES”**

Por

Bello Fumero, Ruben Andrés

Ríos Rodríguez, Agustín

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

2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Dr. Jorge Moraes

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Fernando Dutra

Tercer Miembro:

Dr. Santiago Sosa

Cuarto Miembro:

Dra. Carmen García y Santos

Fecha: **08/12/2016**

Autores:

Rubén Andrés Bello Fumero

Agustín Ríos Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Fernando Dutra, por la posibilidad de realizar el presente trabajo, por su dedicación y colaboración permanente.
- ❖ A la Dra. Carmen García y Santos, por su contribución en el trabajo, así como a todos los integrantes del Departamento de Toxicología de Facultad de Veterinaria.
- ❖ A los Dres. Agustín Romero y Juan García por su gran ayuda en este trabajo.
- ❖ Al personal del Laboratorio Regional Este del DILAVE, "Miguel C. Rubino", por facilitarnos sus instalaciones y todos los medios necesarios para llevar adelante la presente investigación.
- ❖ Al personal de la biblioteca de Facultad de Veterinaria, por su aporte en la realización y corrección del presente trabajo.
- ❖ A Leticia, y demás personal de Bedelía de Facultad de Veterinaria.
- ❖ Al Departamento de Botánica de la Facultad de Agronomía, por su colaboración en el reconocimiento e identificación de la planta, así como su aporte en la realización de la presente revisión bibliográfica.
- ❖ A todos aquellos que de una u otra forma fueron partes de este trabajo.
- ❖ Al grupo de Producción Animal 2014, y demás compañeros de Facultad de Veterinaria.
- ❖ A nuestras familias y amigos, por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	8
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
Planta tóxica	14
Epidemiología de las intoxicaciones por plantas	14
Modo de acción de las plantas tóxicas	16
Diagnóstico de intoxicaciones por plantas.....	16
Control y profilaxis	16
Importancia económica	17
Principales intoxicaciones en ovinos en la región Este del Uruguay	18
Fotosensibilización.....	18
Plantas que causan colangiopatías asociadas a cristales por saponinas	19
<i>Tribulus terrestris</i>	19
<i>Agave</i> spp.....	21
<i>Narthecium ossifragum</i>	22
<i>Nolina texana</i>	23
<i>Brachiaria</i> spp.....	25
<i>Panicum</i> spp.....	27
Principio Activo (Saponinas litogénicas).....	28
Boraginaceae.....	29

<i>Euploca ocellata</i>	30
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
HIPÓTESIS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Lugar físico de desarrollo del estudio	33
Selección de animales e instalaciones	33
Recolección de la planta	34
Identificación de la planta.....	34
Procesamiento y conservación	34
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
Cantidad y forma de administración de <i>Euploca ocellata</i> (Cham.)	36
Eutanasia y necropsia.....	36
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIÓN	49
BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Fig.1. Cordero muerto con síntomas de fotosensibilización.....	11
Fig. 2. Potrero en el que se dio el caso espontaneo, con presencia de <i>Euploca ocellata</i> (Cham.).....	11
Fig. 3. Síntomas de fotosensibilización en diferentes zonas de la cabeza, rodete coronario, y región de la ingle.....	12
Fig. 4. Ictericia de la carcasa.....	12
Fig. 5. Hepatomegalia de color amarillento.....	12
Fig. 6. Colangitis con cristales intraductales.....	13
Fig. 7. Patogenia de la formación de cristales.....	29
Fig. 8. <i>Euploca ocellata</i> (Cham.).....	30
Fig. 9. <i>Euploca ocellata</i> (Cham.) recolectada en la 10° Secc. Policial, en el Departamento de Lavalleja.....	30
Fig. 10. Animal Experimental en pastoreo de Campo Natural.....	33
Fig. 11. Proceso de recolección de la planta.....	34
Fig. 12. Procesamiento de la planta.....	35
Fig. 13. Administración manual de la planta al animal experimental.....	36
Fig. 14. Evolución de los parámetros clínicos en el animal problema.....	38
Fig. 15. Evolución del perfil enzimático en el animal experimental.....	39
Fig. 16. Pequeño foco blanquecino en hígado.....	41
Fig. 17. Trasudado en cavidad abdominal.....	41
Fig. 18. Colangitis linfocítica, hiperplásica, necrotizante.....	41

Fig. 19. Colangitis hiperplásica con estasis biliar.....	42
Fig. 20. Ulceración del epitelio canalicular.....	42
Fig. 21. Degeneración hepatocítica multifocal.....	43
Fig. 22. Hepatitis focal, linfocítica, extensa.....	43
Fig. 23. Colédoco: Colecistitis linfocítica, difusa, moderada.....	44
Fig. 24. Cristales en bilis.....	44

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Evolución del Peso Vivo de los animales durante el ensayo.....	38
Cuadro 2. Análisis físico-químico de orina en el animal experimental.....	40

RESUMEN

La presente Tesis se realizó con la finalidad de demostrar los efectos tóxicos, en la especie ovina, de *Euploca ocellata* (Cham.), previamente conocida como *Helliotropium ocellatum*. Dicha planta fue asociada a la aparición de casos espontáneos de fotosensibilización en ovinos en la zona Este de nuestro país. El ensayo consistió en la intoxicación experimental de un ovino hembra, raza Corriedale, 22 kg de peso vivo. Un ovino macho de la misma raza y de peso similar se utilizó como control. La planta se recolectó en el mes de abril del año 2015, en la 10ª secc. Policial del departamento de Lavalleja, en el paraje Costa de Corrales. En el mismo potrero dónde había ocurrido la enfermedad espontánea. La misma se mantuvo refrigerada a 4 °C hasta el final del ensayo. La reproducción experimental se realizó durante el mes de mayo de 2015. El animal recibió diariamente 40 g/kg/día de la planta, durante 14 días. En este periodo se realizó un monitoreo diario de los animales, observando su comportamiento y actitud, se procedió a la extracción diaria de sangre para funcionalidad hepática, análisis de orina, evolución del peso vivo y a la medición de parámetros clínicos, temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria. En el trabajo experimental no se observaron signos clínicos de enfermedad fotosensible en el animal experimental durante la duración del mismo. Posteriormente se realizó la necropsia, en donde no se encontraron lesiones macroscópicas significativas, en la histopatología la principal lesión encontrada fue una colangitis periportal hiperplásica, asociada a la presencia de cristales en bilis, similar a los casos espontáneos. Los resultados obtenidos sugieren a *Euploca ocellata* (Cham.) como responsable de los brotes de fotosensibilización asociada a cristales en ovinos en la región Este de Uruguay.

SUMMARY

The experiment was carried out with the goal of demonstrating the toxic effects in the ovine species of *Euploca ocellata (cham.)*, previously known as *Helliotropium ocellatum*. This plant was associated with the outbreak of hepatogenous spontaneous photosensitization in sheep production mainly in the east region of our country. The trial consisted of the experimental intoxication of a young ewe, Corriedale breed, 22.4 kg of live weight. In addition, a wether of the same breed and weight was utilized as control treatment. The plant was collected in April 2015, at the 10th Police station in Lavalleja department, at Costa de Corrales, in the same pastureland where the spontaneous disease had appeared. The samples were kept under refrigeration at 4°C during the entire experiment. The experimental intoxication took place during the month of May 2015. The animal received a daily dose of 40 g/kg/day (896 g/100 kg of plant/day) of the plant during 14 days. During this period of time, the animals were assessed daily, and their behavior and attitude were observed. Daily blood sampling for liver function and measurement of clinical parameters such as temperature, heart rate and respiratory rate were also performed. In the experimental work, no clinical signs of photosensitivity were observed in the animal during its duration. At necropsy, no gross lesions were observed, but a hyperplastic periportal cholangitis associated with the presence of bile crystals showed the histological examination. According to results, it is likely that *Euploca ocellata (cham.)* is responsible for the outbreak of photosensitivity associated to crystals in ovines in the eastern region of Uruguay.

INTRODUCCIÓN

Diversos investigadores han estudiado el impacto económico de las intoxicaciones por plantas, tanto a nivel regional (Riet-Correa y Medeiros, 2001; Rissi y col., 2007; Assis y col., 2010), como en nuestro país (Riet-Correa y Medeiros, 2001; Rivero y col., 2011a; Dutra, 2013).

En la región Este del Uruguay, se reportó que las enfermedades de origen toxicológico en ovinos muestran una incidencia de un 19,4 %, mientras que las parasitarias representan un 27,8 %, las bacterianas un 26,9 %, las víricas el 4,6 %, y otras causas el 21,3 % (Dutra, 2013).

La cantidad de plantas diagnosticadas como tóxicas para rumiantes y equinos se incrementa constantemente debido al perfeccionamiento de los diagnósticos (Moraes y col., 2009), los cuales se basan en la patología y reproducción experimental de las enfermedades (Riet-Correa y Medeiros, 2001). En nuestro país se reconocen hasta el momento 45 especies pertenecientes a 37 géneros de plantas tóxicas para ovinos y/o bovinos (García y Santos y Capelli, 2016).

El presente trabajo surge a partir de un brote de fotosensibilización asociada a cristales, ocurrido en la 10^a secc. Policial del departamento de Lavalleja, en el paraje Costa de Corrales, durante el mes de marzo del año 2015. Los animales pastoreaban un potrero de campo natural, de 170 hectáreas, en donde se encontraba pastoreando un lote de 120 ovinos de raza Texel, de diferentes categorías, capones, ovejas y corderos. Del total de animales que pastoreaban en dicho potrero, los que presentaron síntomas fueron exclusivamente corderos, observándose el cuadro de fotosensibilización en 15 de ellos (Morbilidad de un 12,5 %), de los cuales 2 murieron (Mortalidad de un 1,7 %) (Fig. 1).



Figura 1. Cordero muerto con síntomas de fotosensibilización hepatógena. (Fuente: Dutra y col., 2015).

El potrero en el que se encontraban los animales estaba en las orillas de una represa, y los animales pastoreaban únicamente el forraje verde que quedaba al bajar el agua de la misma, que estaba compuesto en su amplia mayoría por *Euploca ocellata* (Cham.) (Fig. 2).



Figura 2. Potrero en el que ocurrió el brote, cubierto en su mayoría por plantas de la especie *Euploca ocellata* (Cham.). (Fuente: Dutra y col., 2015).

Los síntomas clínicos observados fueron los correspondientes a un cuadro de fotosensibilización, con necrosis, edema, grietas en la piel de la cara, base de las orejas, labios, párpados edematizados y cerrados (Fig. 3a y b), dermatitis en la región de la ingle (Fig. 3c) y rodete coronario (Fig. 3d). Además, los animales presentaron síntomas de depresión, cabeza agachada con sacudidas, postración y en 2 casos muerte (Fig. 1) (Dutra y col., 2015).



Figura 3. Síntomas de fotosensibilización en diferentes zonas de la cabeza (a y b), ingle (c) y rodete coronario (d). (Fuente: Dutra y col., 2015).

En la necropsia, los principales hallazgos macroscópicos fueron ictericia de la carcasa (Fig. 4), hepatomegalia con coloración amarillenta (Fig. 5), y la corteza renal se encontró de color verde-amarillento (Dutra y col., 2015).



Figura 4. Ictericia de la carcasa.

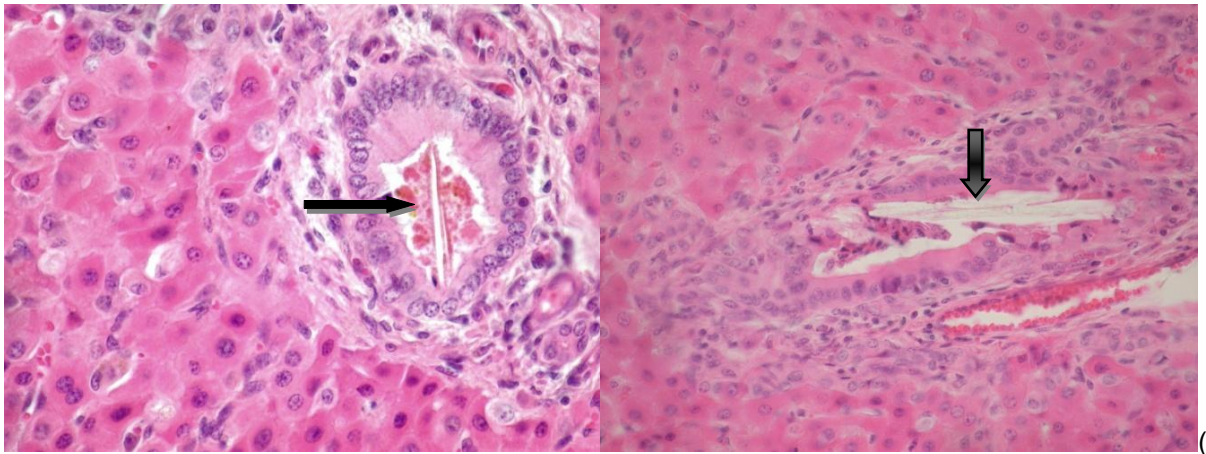


Figura 5. Hepatomegalia, ictericia.

(Fuente de ambas fotos: Dutra y col., 2015).

Los hallazgos más relevantes se encontraron a la histopatología, donde las lesiones de mayor interés se hallaron en el hígado, que presentó colestasis, colangitis hiperplásica y pericolangitis linfocítica, con presencia de macrófagos

espumosos (Fig. 6b). Además, en el interior de los ductos biliares portales se observaron cristales birrefringentes bloqueando la luz ductal (Fig. 6a). El diagnóstico en base a esto fue el de colangiopatía asociada a la formación de cristales (Dutra y col., 2015).



a)

(b)

Figura. 6. Colangitis con cristales intraductales (flechas). (Fuente: Dutra y col., 2015).

El objetivo de este trabajo es conocer si *Euploca ocellata* (Cham.) es causante de fotosensibilización hepatógena en la especie ovina, describir signos clínicos, hallazgos de necropsia y análisis de laboratorio.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Dentro de la presente revisión bibliográfica, se buscará realizar un enfoque de las principales plantas reportadas como causantes de colangiopatía asociada a cristales en distintas partes del mundo, así como ampliar el conocimiento sobre *Euploca ocellata* (Cham.). Para esto, consideramos de vital importancia, entender previamente el concepto de planta tóxica, su modo de acción, la importancia en los sistemas productivos, la epidemiología de las intoxicaciones, como su diagnóstico, control y profilaxis.

Planta tóxica

Se considera planta tóxica de interés pecuario todas aquellas que ingeridas causan perjuicio a la salud de los animales, siendo imprescindible la comprobación experimental de su toxicidad. Dentro de esta definición no están incluidas las plantas que sólo demostraron experimentalmente su toxicidad, o aquellas que evidenciaron un principio activo tóxico por análisis químico u otra técnica de laboratorio sin realizar su comprobación experimental, incluyéndose en la definición sólo las plantas que producen cuadros clínicos patológicos en condiciones naturales (Tokarnia y col., 2000).

Según el principio de Paracelso "*Sola dosis facit venenum*" ("Solo la dosis hace el veneno"), de modo que existen plantas que son tóxicas a muy bajas dosis y nunca podrían ser ingeridas por los animales, como por ejemplo *Baccharis coridifolia* (Riet-Correa y Medeiros, 2001). Por el contrario, otras requieren dosis mucho más altas e incluso presentan un alto valor nutricional por lo que se las utiliza en condiciones forrajeras, como algunas del género *Medicago spp*, *Trifolium spp*, así como *Sorghum spp*. Las plantas sólo son tóxicas bajo determinadas condiciones, las cuales deben conocerse bien para prevenir las intoxicaciones (Villar y Ortiz, 2006).

Epidemiología de las intoxicaciones por plantas

Diversos factores influyen en la aparición de las intoxicaciones por plantas, referentes tanto a éstas como a los animales (Tokarnia y col, 2000). Los factores que a la planta refieren están ligados, por ejemplo, a la etapa de crecimiento en la que la misma se encuentra, de tal manera que algunas serán tóxicas en la fase de brotación (Tokarnia y col, 2000), como por ejemplo la intoxicación por *Vernonia*

plantaginoides (Costa y col., 2014; Dutra y col., 2016). Otras aumentan su toxicidad en caso de floración (Tokarnia y col., 2000), como es el caso de *Nierembergia rivularis* (García y Santos y col., 2012).

La toxicidad también varía de una parte a otra de la hierba, así pues, gran cantidad presentan la mayor toxicidad en sus hojas como *Solanum glaucophyllum* (García y Santos y col., 2007); *Anagallis arvensis* (Rivero y col., 2001), mientras que otras la presentan en partes como frutos, tallos y raíces, como es el caso de *Phytolacca dioica* (Iriarte y col., 2011). Algunas pierden su toxicidad en condiciones de almacenamiento como *Halimium brasiliensis* (Riet-Correa y col., 2009a) y algunas mantienen la toxicidad aún después de secas como *Nerium oleander* (Bonino y col., 2013).

La palatabilidad también es un elemento a tener en cuenta, ya que por el contrario de lo que se cree, acerca de que solamente causan intoxicación las plantas no palatables, un número importante de plantas y hongos son altamente apetecibles (Riet-Correa y col., 1993), como es el caso de la intoxicación por cobre en el pastoreo de *Trifolium repens* (Rivero y col., 1989) o la intoxicación por *Ramaria flavo-brunnescens* (Rivero y col., 2011a).

Por su parte, la sed y el hambre, también adquieren una importancia como factores epidemiológicos, actuando en muchas ocasiones, conjuntamente con el transporte y el desconocimiento de las plantas por parte de los animales (Riet-Correa y col., 1993), como es el caso de la intoxicación por *Baccharis coridifolia* (Riet-Correa y Medeiros, 2001).

Durante épocas en las que hay déficit de pasturas, como el invierno o las sequías, algunas plantas tóxicas permanecen verdes y, frente a la escasez de alimento, a pesar de su menor palatabilidad, son ingeridas por animales hambrientos. La privación de agua también actúa como predisponente, los animales pierden la capacidad de selección y palatabilidad, condición que favorecen la ingesta de plantas tóxicas poco palatables (Riet-Correa y col., 1993), como es el caso de la intoxicación con *C. parqui* (Riet y col., 1979). En lo que a los animales respecta, se debe valorar la especie (no todas tienen la misma vulnerabilidad frente a una misma planta), la pigmentación, el peso corporal, así como las condiciones de manejo que los animales se encuentran (Tokarnia y col., 2000).

Modo de acción de las plantas tóxicas

Es de destacar que la sola presencia de la planta tóxica no lleva a la intoxicación. La mayoría de las veces para que esto ocurra tienen que estar presentes ciertos factores que la favorecen la enfermedad, ya sea ligado a la planta, al animal o al sistema de producción (Riet-Correa y col., 1993).

La mayoría de las plantas tienen principios tóxicos propios, afectando órganos específicos, de modo que unas afectan el tracto digestivo, otras la función cardíaca, otras el aparato renal y otras el sistema nervioso central (Riet-Correa y col., 2007). Para que se produzca un daño en la salud del animal, el mismo debe ingerir una determinada cantidad de planta tóxica, que se relaciona directamente con el peso del animal (Tokarnia y col., 2000).

Diagnóstico de intoxicaciones por plantas

Es necesario para el diagnóstico de las intoxicaciones por plantas conocer las especies tóxicas de la región y los cuadros clínico-patológicos producidos. Son fundamentales los datos epidemiológicos, como presencia de la planta, fase de desarrollo, frecuencia de la enfermedad, época de ocurrencia y condiciones en la que la ingestión acontece. Registrar los signos clínicos, morbilidad, mortalidad y la necropsia de uno o más animales es importante (Tokarnia y col., 2000).

El estudio de la bioquímica sanguínea puede aportar datos importantes para el diagnóstico diferencial en determinados casos. Los estudios toxicológicos y reproducciones experimentales a nivel de laboratorio no son de rutina para el diagnóstico de intoxicación (Riet-Correa y col., 1993), pero si para confirmar el diagnóstico de una especie nueva en una región (Dutra, F. comunicación personal, 2015). La cuantificación del principio activo, puede en ciertas intoxicaciones confirmar el diagnóstico (Riet-Correa y col., 1993).

Control y profilaxis

En las intoxicaciones por plantas, la prevención y el control se ha basado en el entendimiento de factores asociados a éstas, a los animales, al medio ambiente y a factores de manejo. Algunas medidas preventivas que se utilizan incluyen: manejo controlado de animales en pasturas, utilización de otra especie de animal o de categorías resistentes, impedir que animales recientemente transportados con hambre o sed tengan acceso a plantas tóxicas (Riet-Correa y col., 1993).

Como primera medida ante la sospecha de intoxicación por consumo de plantas tóxicas se deben retirar los animales del potrero problema, con el objetivo de evitar que los mismos continúen consumiendo la planta. Cuando nos enfrentamos a una intoxicación que causa muerte súbita, el retiro debe efectuarse con excesivo cuidado y lentamente, porque el ejercicio puede acelerar la muerte de los animales. Cuando se trata de intoxicaciones de evolución subaguda o crónica esta medida de manejo no es efectiva, debido a la existencia de lesiones irreversibles. La segunda medida a ser tomada se refiere al tratamiento de los animales enfermos (Tokarnia y col., 2000).

Es importante señalar que para la gran mayoría de las intoxicaciones por plantas no existen tratamientos específicos o antídotos. Esto hace que prevenir la absorción de los principios activos tóxicos a nivel gastrointestinal, el tratamiento sintomático, así como promover la excreción de sustancias tóxicas, son los tratamientos a elección (Tokarnia y col., 2000).

Por lo tanto, el mayor empeño debe dirigirse a la prevención de la intoxicación, la erradicación de las plantas tóxicas es la mejor medida de profilaxis, lo que es demasiado dificultoso para plantas nativas. Evitar el acceso de los animales en aéreas invadidas por estas plantas en las cuales es imposible su erradicación es así indispensable, mientras que entender el ciclo biológico de la planta en cuestión, nos permite realizar un pastoreo diferencial estacional (Tokarnia y col., 2000).

Otras medidas profilácticas utilizadas son la eliminación de especies de plantas tóxicas por extracción manual, uso de herbicidas, quema o arado de la tierra y el pastoreo con animales no susceptibles. También se ha propuesto la utilización de semillas certificadas en el cultivo de especies forrajeras para evitar la difusión de especies tóxicas (Riet-Correa y col., 1993; Tokarnia y col., 2000).

Importancia económica

Una de las grandes pérdidas de la industria ganadera pastoril se debe las intoxicaciones por planta (James y col., 1992; Riet-Correa, 1993).

Las pérdidas económicas pueden ser directas o indirectas, las primeras asociadas a muertes de animales, disminución de índices reproductivos (abortos, infertilidad), reducción de la productividad de los animales sobrevivientes y otras

alteraciones derivadas de patologías transitorias, como enfermedades subclínicas con disminución de la producción de leche, carne y lana, y aumento de la susceptibilidad a otras patologías por la depresión inmunológica. Mientras que las pérdidas indirectas refieren a los costos de controlar las plantas tóxicas, medidas de manejo para evitar la ocurrencia de intoxicaciones, gastos asociados al diagnóstico y tratamiento de los animales afectados (Riet-Correa y col., 1993; James, 1994).

Principales intoxicaciones en ovinos en la región Este del Uruguay

En el laboratorio DILAVE Miguel C. Rubino de Treinta y Tres, Regional Este. Se han reportado desde el año 1989 a la fecha, intoxicaciones en ovinos por: Cobre; larvas de *Perreyia flavipes*; *Ramalia flavo-brunnescens*; *Cestrum parqui*; *Halimium brasiliensis*; *Vernonia plantaginoides*; *Baccharis coridifolia*; *Nierembergia veitchii*; Nitratos y nitritos; Monensina ; Tilmicocina; fotosensibilización y colangiopatías por cristales en el hígado; (Dutra, 2013; Romero y col., 2013; Dutra, F. comunicación personal, 2016).

Fotosensibilización

Fotosensibilización o fotodermatitis es una enfermedad ocasionada generalmente por vegetales o micotoxinas. Los animales desarrollan una hipersensibilidad a la luz solar de cierta longitud de onda como consecuencia de agentes fotodinámicos en la circulación periférica, produciendo una dermatitis en las zonas de piel depigmentada (Perusia y Rodríguez, 2004).

La fotosensibilización hepatógena es una enfermedad que se produce cuando sustancias hepatotóxicas, plantas venenosas, micotoxinas, fármacos o agentes infecciosos, lesionan el hígado lo suficiente para impedir la excreción de la filoeitrina, que es un metabolito producido en el tracto gastrointestinal como resultado del metabolismo de la clorofila. La filoeitrina es un agente fotodinámico que se elimina por vía hepática. Cuando el hígado está afectado, la filoeitrina se acumula en el torrente sanguíneo, aumenta la sensibilidad de la piel, lo que permite a los rayos ultravioletas (UV) causar lesiones (Scheie y col., 2002; Smith, 2000).

Los signos clínicos de fotosensibilización en el ganado se caracterizan por eritema, formación de arrugas y la formación de costras sobre grandes áreas de la piel, especialmente cuando la piel no es pigmentada y se expone a una alta cantidad de luz solar, como la espalda, el lomo y cuello. Otros signos clínicos son, pérdida de

apetito, nerviosismo, picazón, lagrimeo, poliuria, edema, retrasos en la cicatrización, queratitis, ceguera, ictericia, debilidad y deshidratación, pudiendo provocar la muerte de los animales. De este modo, la fotosensibilización hepatógena causa elevadas pérdidas económicas, debido al daño en el sistema de producción (Stannard, 1994).

Plantas que causan colangiopatías asociadas a cristales por saponinas

Las saponinas intervienen en varias intoxicaciones del ganado que comprenden fotosensibilización secundaria. Algunas de las plantas implicadas incluyen ***Tribulus terrestris*** (Coetzer y col., 1983; Kellerman y col., 1991; Miles y col., 1994; Aslani y col., 2003), ***Agave spp.*** (Mathews y col., 1940; San Andrés y col., 2000), un número de gramíneas tropicales incluyendo a ***Brachiaria spp.*** (Driemerier y col., 2002; Brum y col., 2007; Riet-Correa y col., 2011; Castro y col., 2011; De Oliveira y col., 2013; Gracindo y col., 2014) y ***Panicum spp.*** (Bridges y col., 1987; Odriozola y col., 2009; Riet-Correa y col., 2009), ***Nolina texana*** (Mathews, 1940), y ***Nartheicum ossifragum***, causante de Alveld (Wisløff y col., 2002; Flåøyen y Wilkins, 1997).

Tribulus terrestris

Tribulus terrestris es una planta anual, con distribución mundial, perteneciente a la familia Zygophyllaceae. Se sabe que la ingestión de dicha planta, bajo ciertas condiciones, puede ser causante de brotes de fotosensibilización hepatógena en ovejas y cabras, enfermedad que se conoce como "tribulosis ovina" (Aslani y col., 2003), esta planta es responsable de grandes pérdidas en África del Sur, donde la enfermedad se conoce como Geeldikkop (Cheeke, 1996).

La planta es una hierba postrada, semestral, nutritiva, que esporádicamente se vuelve tóxica bajo ciertas condiciones, por ejemplo cuando las plantas jóvenes se marchitan durante los períodos secos que sigue a las lluvias de verano (Kellerman y col., 1991).

La tribulosis ovina ha sido reportada como de gran impacto económico en Sudáfrica, puesto que más de medio millón de animales pueden verse afectados en una sola estación. Dicha enfermedad también se reportada en otros países, como ser Australia, Estados Unidos, Argentina e Irán (Aslani y col., 2003).

La intoxicación por *T. terrestris*, es una de las enfermedades fotosensibles de los pequeños rumiantes, caracterizada por la deposición de material cristalino birrefringente que produce la oclusión del sistema biliar, lo que causa la acumulación de filioeritrina en bilis y, consecuentemente, en sangre (Aslani y col., 2003).

En cuanto a la patogenia de la enfermedad, se ha sugerido que el principio activo presente en *T. terrestris*, desencadenante de la formación de cristales, son saponinas esteroidales, más específicamente disogenina y yamogenina, las que una vez ingeridas son metabolizadas a epismilagenina y episarsasapogenina (Miles y col., 1994). Estas últimas se encontraron presentes en cristales biliares de ovejas intoxicadas experimentalmente con *T. terrestris*, los que estaban formados por una mezcla de sales de calcio, epismilagenina y episarsasapogenina (Miles y col., 1994).

En un experimento realizado en Irán por Aslani y col. (2003), se observó que ovejas en las que la intoxicación se reprodujo experimentalmente, manifestaron distintos grados de fotosensibilización, con síntomas que variaron desde un leve prurito, a la aparición de costras secas, fotofobia, secreción ocular serosa, ictericia, depresión, pérdida de apetito y peso corporal. Los indicadores séricos de daño hepático, como ser la Aspartato aminotransferasa (AST), la Fosfatasa alcalina (FAS) y bilirrubina total, también se mostraron aumentados en dicho experimento. Histológicamente, en hígados de animales afectados se observaron cantidades variables de cristales en los conductos biliares (Aslani y col., 2003).

No se ha explicado la condición eventual en la que ocurren los brotes de Geeldikkop, diferentes investigadores han reportado la presencia de esporidesmina asociado a los brotes de tribulosis ovina, se especula que niveles bajos de ésta podrían desencadenar la enfermedad (Kellerman y col., 1980). Wilkins y col., (1996) sugirieron la existencia de poblaciones de *T. terrestris* litogénicas y no litogénicas, diferencia que radica en el tipo de saponina que cada planta contenga, y que se cree, que puede estar determinada por factores genéticos (inherentes a la propia planta) o ambientales. Sin embargo Wang, (1991) propone diferencias estacionales en la concentración de saponinas presentes en *T. terrestres* para explicar lo ocasional de la ocurrencia de los brotes.

Agave spp.

Agave lechuguilla y *Agave americana* pertenecientes a la familia de las Agavaceae, son hierbas perenne muy robustas, de hojas sentadas, de base envainante y margen espinoso (San Andrés y col., 2000). Se desarrollan en zonas bajas, como al pie de las colinas, valles secos y bordes de camino. *A. americana* está propagada por diversas partes de Europa, en cambio *A. lechuguilla* se encuentra principalmente en los desiertos de Chihuahua y Sonora de Estados Unidos y México. Contienen diosgenina y esmilagenina, las cuales tienen mayor concentración en la planta joven que en la madura (Mathews y col., 1938; San Andrés y col., 2000).

Wall y col. (1962) reportaron que las hojas de *Agave lechuguilla* contienen, en promedio un 1% de esmilagenina (una variedad de sapogenina soluble en agua), como único constituyente de sapogenina presente en la planta. A su vez, establecieron que existiría un pico en la concentración de sapogeninas presentes en la planta en torno al mes de setiembre, y que las hojas verdes, raíces y hojas marchitas contienen el mismo porcentaje (en base seca) de esmilagenina.

Otros investigadores reportaron, además de la esmilagenina, la presencia de 8 sapogeninas más: yucagenina, gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina (Blunden y col., 1980).

La intoxicación por esta planta ocasiona el síndrome llamado “Cabeza Hinchada”, “Fiebre de la Cabra” y “Fiebre de la Lechuguilla”, que afecta a ovinos y caprinos y rara vez a bovinos. La morbilidad es variable, entre el 5 y 30 % (Mathews y col., 1938).

Las principales características del cuadro clínico son indiferencia, debilidad, anorexia, inflamación facial, secreción ocular y nasal serosa amarillenta, mucosas ictéricas, orina oscura, e incluso la muerte (Mathews y col., 1938; San Andrés y col., 2000).

Las lesiones encontradas son muy similares en ambas especies de *Agave*. Alteraciones cutáneas, deshidratación, necrosis de la piel en zonas no pigmentadas con desprendimiento y edema subcutáneo en la cabeza. El hígado se encuentra hipertrófico y degenerado, de coloración amarillo, con la cápsula engrosada, la vesícula biliar se encuentra distendida y ocasionalmente tiene consistencia pastosa,

los conductos biliares engrosados y ocluidos (Mathews y col., 1938; San Andrés y col., 2000).

A la microscopia del hígado se observó edema intracelular del endotelio capilar, infiltración edematosa, infiltración grasa del parénquima hepático, pigmentos biliares y ductos de diferentes tamaños con cristales en su interior (Mathews y col., 1938). Lesiones degenerativas en riñones (San Andrés y col., 2000), precipitados de células y albuminas, que obstruyen los túbulos, produciendo necrosis e hiperplasia del tejido renal (Mathews y col., 1938). Aumento de enzimas hepáticas y bilirrubinemia (San Andrés y col., 2000), aumento de polimorfonucleares y nitrógeno no proteico en sangre. En orina se observó presencia de albúminas (Mathews y col., 1938).

Narthecium ossifragum

Alveld, como se conoce normalmente a la intoxicación por la ingestión de *Narthecium ossifragum*, es una enfermedad fotosensible, de origen hepático, que afecta a ovejas (mayormente corderos) en la costa oeste de Noruega, las Islas Británicas, y en las Islas Faroe (Wisløff y col., 2002). Perteneciente a la familia de las Nartheciaceae, esta hierba perenne florece entre junio y agosto, y pudiendo alcanzar entre los 15 a 40 centímetros de altura, crece en terrenos ácidos y pobres en nutrientes. Además de los ya nombrados, se ha reportado su presencia en los Países Bajos, Bélgica, en el noroeste Alemania, el oeste y el centro de Francia, norte de España y Portugal (Cheeke, 1996).

Diversos intentos de inducir fotosensibilización en corderos mediante la administración de *N. ossifragum* aún no han sido exitosos (Flåøyen y col., 1991). Sin embargo, se ha logrado producir fotosensibilización en corderos mediante la administración de grandes dosis de saponinas crudas obtenidas de esta planta (Flåøyen y Wilkins, 1997).

Así mismo, *N. ossifragum* ha sido reportada como causante de nefrotoxicosis en ganado bovino y ovino, aunque los resultados experimentales han sugerido que la toxina responsable de producir el daño renal no sería la misma que la causante de la enfermedad hepática (Flåøyen y Wilkins, 1997). Por otra parte, en un experimento realizado por Wisløff y col., (2002), se reportó que las saponinas presentes en *N. ossifragum* tendrían muy poca o ninguna importancia en la producción de

enfermedad renal, ya que no fueron encontradas saponinas libres ni conjugadas en la orina de animales alimentados con dicha planta.

Las saponinas que se encuentran en mayor proporción en *N. ossifragum* son los glucósidos de sarsapogenina y esmilagenina. Una vez ingeridas, estas saponinas son rápidamente hidrolizadas en el rumen a sapogeninas libres, las que se reducen, para formar episapogeninas. Posteriormente ambas, episapogenina y sapogenina, son absorbidas en duodeno y yeyuno y transportadas vía porta al hígado, donde se conjugan con el ácido glucorónido, para su posterior excreción a la bilis (Flåøyen y Wilkins, 1997).

La enfermedad producida por la ingestión de *N. ossifragum* es similar a la que se da en cuadros de intoxicación por animales que pastorean *T. terrestris*, *A. lechuguilla*, *Panicum* spp., *Brachiaria decumbens* o *Nolina* spp. (Wisløff y col., 2002). Wisløff y col., (2002), respaldó lo sugerido años anteriores por Flåøyen y col., (1999), quien sugirió que la acumulación de filoeitrina en Alveld es provocada por una disfunción, o un daño, de los hepatocitos, y no por obstrucción de los ductos biliares.

Nolina texana

Nolina texana S. Watson (Sacahuiste), de la familia de las Aspargáceas, es una planta perenne, con una base leñosa gruesa, de aproximadamente 15 centímetros de altura. Está presente en Estados Unidos, en los estados de Texas y Nuevo México. Su hábitat natural son prados, terrenos pedregosos y colinas bajas (Mathews, 1940).

La intoxicación con *Nolina texana*, o “*Sacahuiste*”, es por lo general conocida como “Cabeza hinchada” o “Fevered” (Mathews, 1940). Esta intoxicación afecta a ovejas, cabras y raramente a bovinos. Los brotes naturales se dan en la época de floración de la planta, generalmente a principios de abril, pero puede adelantarse o atrasarse en función de las variaciones climáticas del momento (Mathews, 1940).

Según lo describió Mathews (1940) la morbilidad varía del 1 al 20 % de los animales, dependiendo del número de plantas florecidas que se encuentren en el momento. Una elevada floración es asociada con una mayor morbilidad, y de la misma manera, una menor floración se corresponde con un número menor de animales afectados. La mortalidad es por lo general igual a la morbilidad, ya que

muy pocos animales se recuperan si es que han ingerido suficiente material tóxico como para producir signos de enfermedad evidentes (Mathews, 1940).

En el ganado bovino, las pérdidas raramente son tan severas como en cabras u ovejas (Mathews, 1940), siendo las cabras son más susceptibles que las ovejas (Petersen & Ueckert, 1992)

La enfermedad se caracteriza por ictericia, lesiones en hígado y riñón, así como edema en la zona de la cara y orejas. La sintomatología y patología son similares a las observadas en animales intoxicados por *A. lechuguilla*, o bien, a otras plantas que produzcan enfermedad fotosensible (Mathews, 1940).

Mathews, (1940), estableció que en los casos naturales la sintomatología clínica se caracteriza por pérdida del apetito, ictericia (caracterizada por un inusual amarillo intenso), sed, postración y apartamiento de la majada. Los corrimientos oculares y nasales, primero serosos y después mucopurulentos, también son un síntoma clínico frecuente. Finalmente se da un adelgazamiento progresivo evolucionando hacia la muerte de los animales al cabo de una o dos semanas de iniciado el cuadro clínico.

En la necropsia, sumado a la ictericia, las lesiones en hígado y riñón son constantemente reportadas en todos los animales. El hígado se presenta de color amarronado a verdoso, y con una apariencia ligeramente grasa, y al corte, se evidencia la presencia de tapones de color verde que obstruyen los conductos biliares. Por su parte, los riñones se encuentran agrandados, en ocasiones hasta el doble de su tamaño, de color verde-amarronado (Mathews, 1940).

Microscópicamente se observan los conductos biliares obstruidos por tapones, que consiste en cristales de colesterol rodeados de detritos celulares, de manera similar a lo que se observa en la intoxicación por *A. lechuguilla* (Mathews, 1940).

La dosis tóxica para la especie ovina de esta planta es del 1,1 % del peso vivo aproximadamente (Petersen & Ueckert, 1992). Según lo estableció Mathews (1940), el principio activo de *N. texana* es una hepato-nefrotoxina. Este principio activo produce una degeneración del parénquima hepático, que tiene como resultado una ictericia de tipo obstructiva y una disfunción del órgano. Esto, sumado a la presencia de forraje verde en la dieta, produciría una acumulación de filoveritrina en sangre, la cual es un agente fotodinámico, causando así una consecuente fotosensibilización

(Mathews, 1940). Los animales que consumieron suficiente planta como para desarrollar síntomas clínicos, rara vez se recuperan (Petersen & Ueckert, 1992).

***Brachiaria* spp.**

Las especies de *Brachiaria* son forrajeras importantes de las regiones tropicales como África, Asia, Australia y América del Sur (Brum y col., 2007), son gramíneas, anuales o perennes (Machado y col., 1989), pertenecientes a la familia Poaceae (Catasús, 1997).

Brachiaria decumbens es uno de los componentes más abundantes de las pasturas en la sabana brasileña y se ha convertido en los últimos años en una fuente importante de alimento para los rumiantes en Brasil (Driemerier y col., 2002).

Se ha reportado a *B. decumbens* como agente causal de brotes esporádicos de fotosensibilización hepatógena en ganado en pastoreo sobre campos que contenían dicha planta. (Driemerier y col., 2002). Intoxicaciones con *B. decumbens*, *B. humidicola* y *B. brizantha* están reportadas en Brasil y en otras partes del mundo, afectando a bovinos, ovinos, caprinos y equinos, (De Oliveira y col., 2013).

Inicialmente, la enfermedad se atribuyó a esporas de *Phitomyces chartarum*, sin embargo alteraciones histológicas de colangiopatía asociada a cristales similares a los encontrados en el envenenamiento por otras plantas sugirieron que la intoxicación por *Brachiaria* spp era debido a saponinas litogénicas (Brum y col., 2007).

Las saponinas presentes en *B. decumbens* han sido descritas como un principio activo con participación determinante en la ocurrencia de dicha intoxicación (Driemeier y col., 2002). Son glicósidos de terpeno de esteroides o policíclicos que se caracterizan por la presencia de una parte lipófila (esteroide o triterpeno) y una parte hidrófila (azúcar). Están ampliamente distribuidas en las plantas y se producen en el metabolismo secundario de las mismas (De Oliveira y col., 2013).

El cuadro clínico cursa con, anorexia, depresión, boca seca, dermatitis de las orejas, cara y en la zona ocular, secreción nasal amarillenta (Brum y col., 2007) cambios ruminales y trastornos neurológicos (Driemeier y col., 2002). En la necropsia se observan lesiones en el morro, ictericia moderada, aumentó del patrón lobular del hígado, vesícula biliar distendida y en algunos casos opacidad corneal (Brum y col., 2007).

La principal alteración histológica en el hígado fue en forma de agujas de cristales, imágenes negativas de colesterol, en el lumen de algunos conductos biliares, asociada con una infiltración moderada periductal de células inflamatorias mononucleares. También se observó proliferación de las células de los conductos biliares. Hubo una inflamación severa difusa y vacuolización de los hepatocitos. Macrófagos espumosos, principalmente en la zona centroacinar, algunos de ellos también contiene imágenes negativas de cristales (Brum y col., 2007). Lo que sugiere que se forman como consecuencia de la fagocitosis de cristal. Estos macrófagos espumosos no se han reportado en la intoxicación por otras plantas que contienen saponinas litogénicas, excepto en células de Kupffer hipertróficas que contienen cristales, observados en la intoxicación por *Panicum coloratum* (Bridges y col., 1987). Dichos cristales son birrefringentes cuando se observan a luz polarizada (Driemeier y col., 2002).

El corazón mostró áreas multifocales de la degeneración y necrosis de fibras musculares asociadas con la proliferación del tejido conectivo y la infiltración leve de células mononucleares. En los riñones, se observaron la presencia de cristales, la imagen negativa de colesterol en el lumen de algunos túbulos, en ocasiones con presencia de células multinucleadas gigantes (Brum y col., 2007).

Las manifestaciones clínicas y la mortalidad en las intoxicaciones por *Brachiaria* spp. dependen de factores relacionados con la planta y con la susceptibilidad o resistencia del animal (Castro y col., 2011). *Brachiaria decumbens* tiene mayores concentraciones de saponinas y es más tóxica que *B. brizantha* o *B. humidicola*. Esta última posee concentraciones de saponina más bajas y es mucho menos tóxica que *B. brizantha* (Riet-Correa y col., 2011). En estado de brotación las especies de *Brachiaria* contiene mayores concentraciones de saponinas las plantas maduras (Castro y col., 2011). Los ovinos son más susceptibles que los bovinos (Riet-Correa y col., 2011), y los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos (Castro y col., 2011). Los animales que nunca han consumido especies de *Brachiaria*, son más susceptibles que los animales criados en pasturas de *Brachiaria* spp. (Castro y col., 2011; Gracindo y col., 2014).

El mecanismo de resistencia a la intoxicación todavía no está claro, pero es probable que se produzca como resultado de la selección natural en la cría de los animales en este tipo de pasturas (Castro y col., 2011; Riet-Correa y col., 2011).

El uso de animales resistentes puede contribuir al control de intoxicación por *Brachiaria* spp. pero otras medidas, como el uso de especies con bajas concentraciones de saponinas, son necesarias para la profilaxis de la intoxicación (Gracindo y col., 2014).

***Panicum* spp.**

Pertenecientes a la familia de las Poaceae, estas especies habitan en ambientes muy variados, desde terrenos secos a húmedos (Guglieri y col., 2004). Son gramíneas, que por su fortaleza, en casos de sequía, han sido utilizadas considerablemente en las Regiones Semiárida (Odriozola y col., 2009), en Brasil, Argentina, Canadá, en algunos países de Europa y Asia. Así como gran parte de África y Oceanía (Häfliger y Scholz, 1980). La intoxicación por especies de *Panicum* en ovinos y bovinos es conocida como Dikkor (Bridges y col., 1987).

Distintas especies de éste género se han reportado como causantes de intoxicación en los animales, como es el caso de *P. dichotomiflorum* (Munday y col., 1993), *P. coloratum* L. (Bridges y col., 1987), *P. schinzii* (Miles y col., 1992), y *P. miliaceum* L. (Badiei y col., 2009), y *P. virgatum* (Puoli y col., 1992). Otras especies reportadas como tóxicas son *P. decompositum*, *P. effusum*, *P. máximum* y *P. laevifolium* (Clare, 1952, 1955. Citados por Riet-Correa y col., 2009).

Diferentes tipos de *Panicum* spp., se emplean en la alimentación animal como verdeo de verano y para producir reservas (Odriozola y col., 2009). Estas plantas contienen saponinas esteroideas litógenas, como dichotomin, que se hidroliza en diosgenina y yamogenina. Éstas en rumen se metabolizan a epismilagenina y episarsasapogenina, se conjugan con el ácido glucurónico y luego se combinan con sales de calcio para formar cristales en los conductos biliares (Miles y col., 1991). Esta aglomeración de cristales en los canalículos biliares genera colestasis, con incremento sérico de filoeitrina, generando dermatitis en zonas despigmentadas de piel cuando éstas están expuestas a la radiación UV (Odriozola y col., 2009).

Los principales síntomas observados por Riet-Correa y col., (2009) en un caso de intoxicación por *P. dichotomiflorum* fueron edema de la cabeza, seguido de dermatitis, principalmente en la cara, las orejas y la grupa, secreción ocular, opacidad corneal con ceguera, enrojecimiento de la banda coronaria, ictericia, disnea y taquicardia.

En la necropsia el hígado y los riñones se vieron afectados en casos de *P. miliaceum* (Badiei y col., 2009). Sin embargo en *P. dichotomiflorum* no se observaron lesiones significativas en otros órganos de las cavidades torácica, abdominal y sistema nervioso central (Riet-Correa y col., 2009), tampoco se constató daño renal en la intoxicación por *P. cloratum*. Si se observó necrosis de hepatocitos, obstrucción de los pequeños conductos biliares y canalículos pequeños por unos agregados de cristales birrefringentes, y su acumulación en fagocitos dentro de la sinusoide (Bridges y col., 1987). El número de cristales en el hígado puede variar, dependiendo de la cantidad de tiempo de exposición a plantas tóxicas y la gravedad de las anomalías hepáticas (Bridges y col., 1987).

Principio Activo (Saponinas litogénicas)

Las saponinas son productos obtenidos de metabolismo secundario de la planta. Funcionan en los procesos de defensa de las plantas, y pueden ser producidos en grandes cantidades bajo situaciones de estrés, tales como hongos y ataque de bacterias, asegurando beneficios de supervivencia para el ecosistema al que pertenece la planta (Wina y col., 2005)

Se han identificado diferentes tipos de saponinas en plantas, como esmilagenina, epismilagenina, zarcasapogenina, episarsasapogenina, tigogenina, epitigogenin, neotigogenin, diosgenina, epidiosgenin, yamogenina, gitogenin, y neogitogenin (Miles y col., 1994), yucagenina, gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina (Blunden y col., 1980). De las cuales algunas son litógenas y otras no, siendo las primeras las responsables de la formación de cristales (Miles y col., 1994).

Dentro de las saponinas litógenas *A. lechuguilla* contiene Diosgenina y Esmilagenina (Mathews y col., 1938), en cambio *Nartheccium ossifagum* posee Sarsapogenina y Esmilagenina (Flåøyen y Wilkins, 1997). En el caso de *Tribulus terrestris*, *Brachiaria* spp. y *Panicum* spp., estas presentan diosgenina y yamogeninas (Miles y col., 1993; Miles y col., 1994).

En el rumen la saponinas, se metabolizan a epismilagenina y episarsasapogenina, posteriormente llegan al hígado y se conjugan con el ácido glucurónico para luego combinarse con sales de calcio y formar cristales, que precipitan en los conductos biliares (Miles y col., 1991). Esto provoca una colestasis,

interrupción en la excreción de bilis y consecuente retención de filioeritrina, produciendo un cuadro de fotosensibilización (Cheeke, 1996) (Fig. 7).

Todos los pasos metabólicos, con la excepción de la conjugación con el ácido glucorónico y formación de la sal de calcio, se producen en el rumen (Miles y col., 1994).

La formación de cristales probablemente implica la hidrólisis de los azúcares de la saponina seguido por reducción del doble enlace 5-6, epimerización de la 3-b-OH a 3-a-OH y, finalmente en el hígado la conjugación con el ácido glucorónico (Miles y col., 1991).

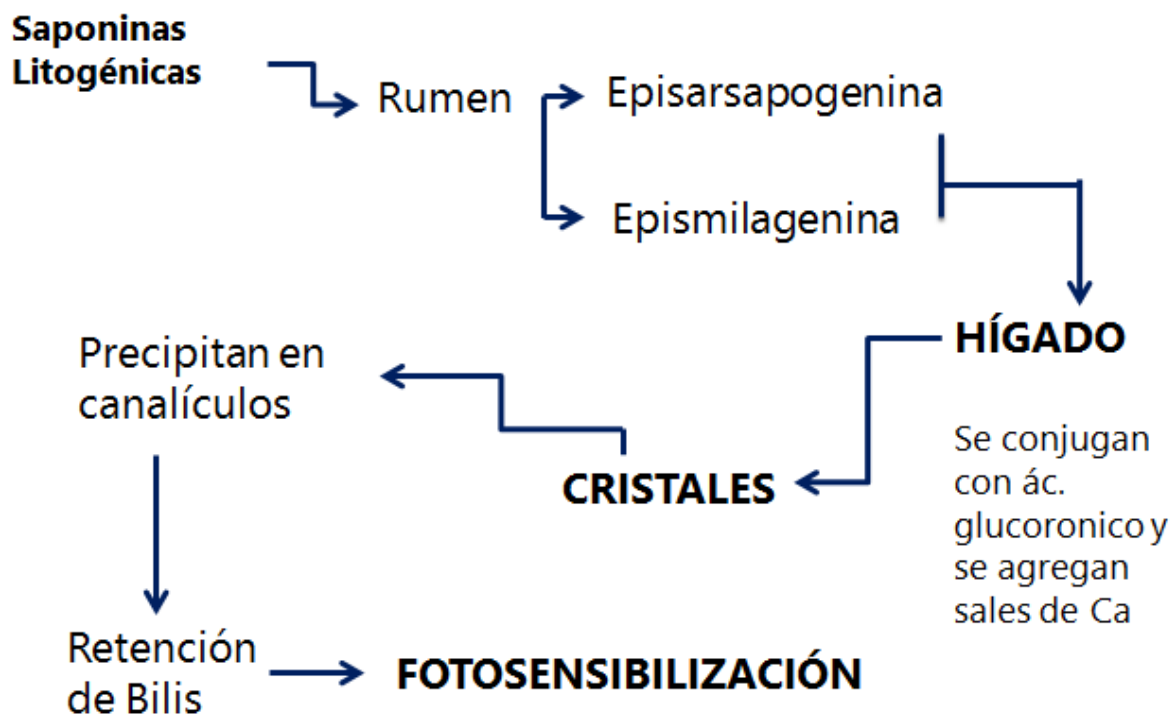


Figura 7. Patogenia de la formación de cristales en los ductos biliares.

Boraginaceae

Las Borragináceas componen una familia subcosmopolita bien representada en las regiones templadas y subtropicales. Comprenden unos 117 géneros y alrededor de 2400 especies, en general plantas herbáceas, anuales o perenes, raramente enredaderas, arbustos rastreros o de pequeño porte. Sus integrantes acostumbran tener un indumento, conformado por pelos más o menos rígidos característico que los hacen ásperos al tacto (Izco y col., 2004).

En la familia pueden reconocerse cuatro subfamilias, *Boraginoideae*, *Cordioideae*, *Ehretioideae* y *Heliotropioideae* (Izco y col., 2004).

Euploca ocellata

El género *Euploca* fue reportado en 1837 Nuttall. Posteriormente se lo estableció como un sinónimo del género *Heliotropium*, hasta que finalmente, en el año 2003, producto de estudios filogenéticos, Hilger y Diane restablecieron a *Euploca* como un género (Miranda y Semir, 2009). La especie *E. ocellata* fue descrita por primera vez por Adelbert von Chamisso, y recibió su nombre actual de Miranda y Semir en el 2009 (José Miranda comunicación personal, 2015).

Las plantas pertenecientes a dicho género se caracterizan por la presencia de brácteas en las inflorescencias, un largo pedicelo axilar o supra axilar, y ocasionalmente flores solitarias, cuatro núculas, anteras coherentes en sus ápices, embrión curvo y anatomía Kranz en la gran parte de sus especies. (Miranda y Semir, 2009) (Fig. 8 y 9).

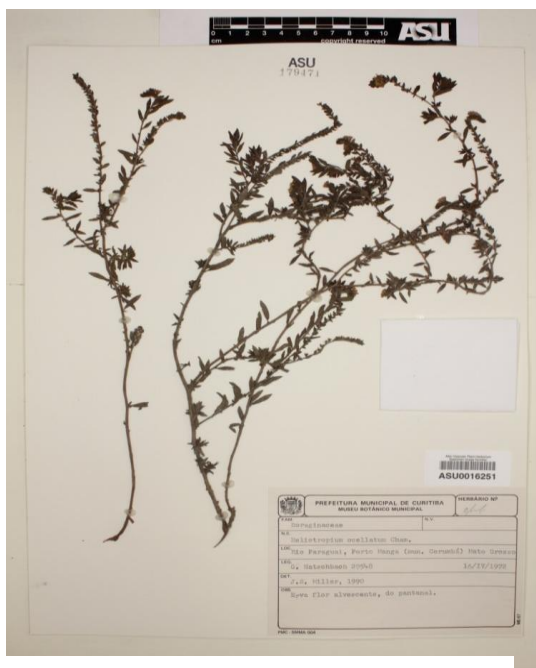


Figura 8. *Euploca ocellata* (Cham.).
(www.herbariovaa.org)



Figura 9. *Euploca ocellata* (Cham.), recolectada en la 10ª secc. Policial del departamento de Lavalleja.

El género *Euploca* incluye aproximadamente 120 especies, distribuidos en las zonas tropicales, subtropicales y regiones templadas, comprenden aproximadamente la mitad de la sub familia *Heliotropiaceae* Schrad. (Miranda y Semir, 2009).

Euploca ocellata (Cham.) se encuentra en Argentina, Brasil y Uruguay asociada a campos anegados (Miranda y Semir, 2009).

En nuestro país, *Euploca ocellata* (Cham.) solo esta reportada en los departamentos de Artigas, Salto, Rivera y Tacuarembó según el herbario de la Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía (Ana González, comunicación personal, 2015).

La misma no está identificada como una planta tóxica, aunque recientemente se han constatado brotes de fotosensibilización en la región Este del Uruguay, en zonas donde la misma se encuentra presente en gran cantidad, y se tiene la sospecha de que la aparición de la enfermedad está asociada a una lesión hepática producida por la ingestión de dicha planta (Dutra y col., 2015).

OBJETIVO GENERAL

Demostrar experimentalmente la participación de *Euploca ocellata* (Cham.) en la aparición de brotes de fotosensibilización hepatógena en ovinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Indagar acerca de cuadros de colangiopatías asociadas a cristales en ovinos.
- Recabar información sobre *Euploca ocellata* (Cham.).
- Determinar el cuadro clínico, bioquímica sanguínea, lesiones macroscópicas e histológicas que produce la administración experimental de *Euploca ocellata* (Cham.) en ovinos.

HIPÓTESIS

La ingestión de *Euploca ocellata* (Cham.) es causante de fotosensibilización por colangiopatía asociada a cristales en ovinos en la región Este de Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar físico de desarrollo del estudio

El ensayo experimental se realizó en el mes de mayo del 2015 en el predio de DILAVE Miguel C. Rubino Laboratorio Regional Este, Avelino Miranda 2045, Treinta y Tres (Uruguay).

Selección de animales e instalaciones

El manejo de los animales experimentales se realizó de acuerdo a la ordenanza sobre el uso de animales de experimentación docencia e investigación universitaria de la UdelaR (CEUAFVET 234). Se utilizaron dos ovinos, raza Corriedale, uno macho y otro hembra, clínicamente sanos, de 4 a 5 meses de edad y con buen estado corporal, provenientes de una zona libre de la planta problema.

Los animales fueron pesados, desparasitados e identificados como Experimental de 22,4 kg y Control de 24,1 kg de peso vivo. Ambos ovinos, permanecieron durante todo el ensayo en un potrero de campo natural, con sombra y agua *ad libitum*. (Fig. 10)



Figura 10. Animal experimental en pastoreo de campo natural. Predio del DILAVE Treinta y Tres, Mayo del 2015.

Recolección de la planta

La planta se recolectó manualmente en el mes de abril del año 2015, en la 10ª sección policial del departamento de Lavalleja, en el paraje Costa de Corrales, para posteriormente procesarla en el laboratorio. (Fig. 11)



Figura 11. Proceso de recolección de la planta en el potrero problema (abril de 2015).

Identificación de la planta

Para su identificación, muestras de plantas enteras se remitieron al Laboratorio de Botánica de la Facultad de Agronomía (UdelaR).

Procesamiento y conservación

La planta se procesó en el laboratorio, eliminando otras plantas y restos de ellas, así como raíces y tallos gruesos. Posteriormente las partes aéreas se colocaron en bolsa de nylon y se refrigeraron en cámara de frío a 4 °C hasta su administración. (Fig. 12)



Figura12. Procesamiento de la planta en Laboratorio DILAVE Treinta y Tres. Abril del 2015.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales llegaron al predio del Laboratorio DILAVE el día 5 de mayo del año 2015. Previo a la administración de la planta se realizó el pesaje de los mismos, examen coprológico (por método de Mc. Master), desparasitación con Ivermectina 1% (1mL de Ivermic 1%), examen clínico, extracción de muestras de sangre y examen bioquímico de orina con tira reactiva (Wiener Lab). No se realizó examen coprológico por método de Happich y Boray puesto que los animales llegaron con una dosificación con Closantel del establecimiento de origen.

El día 7 de mayo comenzó la administración de la planta, y se realizó durante 14 días, finalizando el 20 de mayo del 2015.

Durante el tiempo que duró la intoxicación experimental se realizó una evaluación de los parámetros clínicos de temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria, así como la observación del sensorio y una evaluación semiológica detallada de la piel y mucosas. Además se realizó la toma de muestras de sangre venosa, extraída por punción de la vena yugular, con jeringa estéril y aguja de 18 G dos veces por día, realizándose posteriormente la centrifugación, extracción del suero, identificación y congelado de las muestras. Estas actividades se realizaron diariamente con una frecuencia de dos veces por día, en las horas 8 AM y 8 PM.

Las muestras de suero se remitieron al laboratorio de análisis clínico de Facultad de Veterinaria para examen de funcionalidad hepática, midiendo los valores de Fosfatasa alcalina sérica (ALP o FAS), Aspartato aminotransferasa (GOT o AST), Gamma glutamil transpeptidasa (GGT), Colesterol, Bilirrubina total, Proteínas totales, Albúminas y Globulinas.

Se procedió en tres oportunidades a la realización del pesaje de los animales, los días 5, 13 y 20 del mes de mayo. Además se realizaron cinco exámenes bioquímicos de orina con tira reactiva (Wiener lab), los días 5, 8, 11, 13 y 20 del mismo mes.

Cantidad y forma de administración de Euploca ocellata (Cham.)

El animal Experimental, recibió la dosis establecida de planta mediante administración forzada en cavidad oral. La misma se llevó a cabo por medio de bolos alimenticios que fueron suministrados manualmente (Fig. 13).

La planta se administró en forma de planta fresca, a razón de 40 g/kg (880 gr diarios), en dosis única durante 14 días seguidos.



Figura 13. Administración manual de la planta en bolos al animal experimental. (DILAVE Treinta y Tres, Mayo del 2015).

Eutanasia y necropsia

El 20 de mayo, concluidos los 14 días de suministrar la planta, se procedió a realizar la eutanasia y necropsia del ovino experimental (Fig. 14).

Para la eutanasia se utilizó xilacina al 2% intramuscular y posterior administración de tiopental sódico intravenoso, según establecen los lineamientos de la Comisión de Bioética de Facultad de Veterinaria y el laboratorio DILAVE.

Posterior a esto se realizó la necropsia, buscando encontrar y documentar los hallazgos anatómo-patológicos más relevantes que hayan ocurrido. Así mismo, se procedió a la extracción de muestras de distintos órganos, incluyendo todos los lóbulos hepáticos, la vesícula biliar y el colédoco, y fijación de las mismas en formol bufferado al 10 % durante 15 días. Las muestras se incluyeron en parafina, se deshidrataron en alcohol, se cortaron a 5-7 micras y se colorearon con hematoxilina-eosina para su estudio histológico.

RESULTADOS

La identificación de la planta se realizó en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía de la UdelaR (Ing. Agr. Ana González), donde se determinó que la planta remitida, se trataba de *Euploca ocellata* (Cham.).

En cuanto a la evolución del peso vivo de los animales, los mismos fueron pesados en tres instancias durante el ensayo, los días 5, 13 y 20 del mes de mayo, sin observarse variaciones relevantes (Cuadro 1).

Animal	Peso 1	Peso 2	Peso 3
Experimental	22,4	22,7	23,6
Control	24,1	23,8	23,6

Cuadro 1. Evolución del peso vivo de los animales durante el ensayo.

En el ensayo experimental no se observaron signos clínicos de enfermedad fotosensible en el animal experimental durante los 14 días de administración de la planta. Los parámetros clínicos evaluados mostraron, en ambos animales (experimental y control), distintos valores a lo largo del ensayo, pero ninguna de estas variaciones fue relevante a la hora de analizarlos. La temperatura corporal se mantuvo en un rango de 39° a 40,4° en el animal experimental y de 39° a 40,5° en el animal control. La frecuencia cardiaca mostro un mínimo de 68 y un máximo de 120 en el animal experimental y 72 y 128 en el animal control, mientras que la frecuencia respiratoria oscilo entre un mínimo de 36 y máximo de 80 para ambos animales. (Fig. 14).

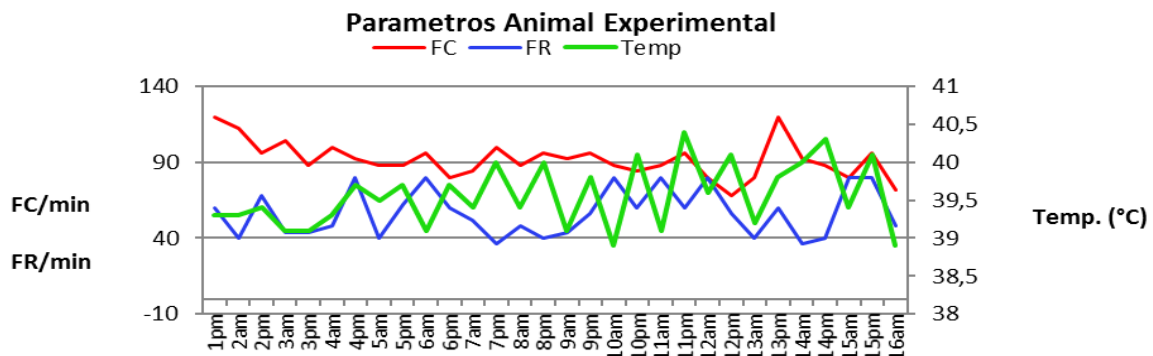


Figura. 14. Evolución de los parámetros clínicos del animal experimental (Frec. Cardiaca, y Respiratoria, y Temperatura) durante el ensayo.

Por su parte, el funcional hepático, tampoco mostró resultados significativos, o indicativos de enfermedad hepática, la enzima FAS se mostró al inicio con valores elevados, previo a la administración de la planta, que paulatinamente fueron bajando hasta ubicarse dentro de los valores normales. La GGT, mostró un leve aumento a partir de la mañana del día 10, pero que nunca alcanzó un valor que superara los parámetros normales para esta enzima (Fig. 15).

La AST (GOT) se mostró elevada durante todo el ensayo, bastante por encima de sus parámetros normales, pero el hecho de que no es una enzima específica del hígado, que se encuentra elevada desde el día 1, que el animal control mostró valores similares para esta enzima, y que además no está acompañada de otro indicador que le proporcione mayor fidelidad a este hallazgo, impide que sea tomado en cuenta como indicador de daño hepático a causa de la intoxicación.

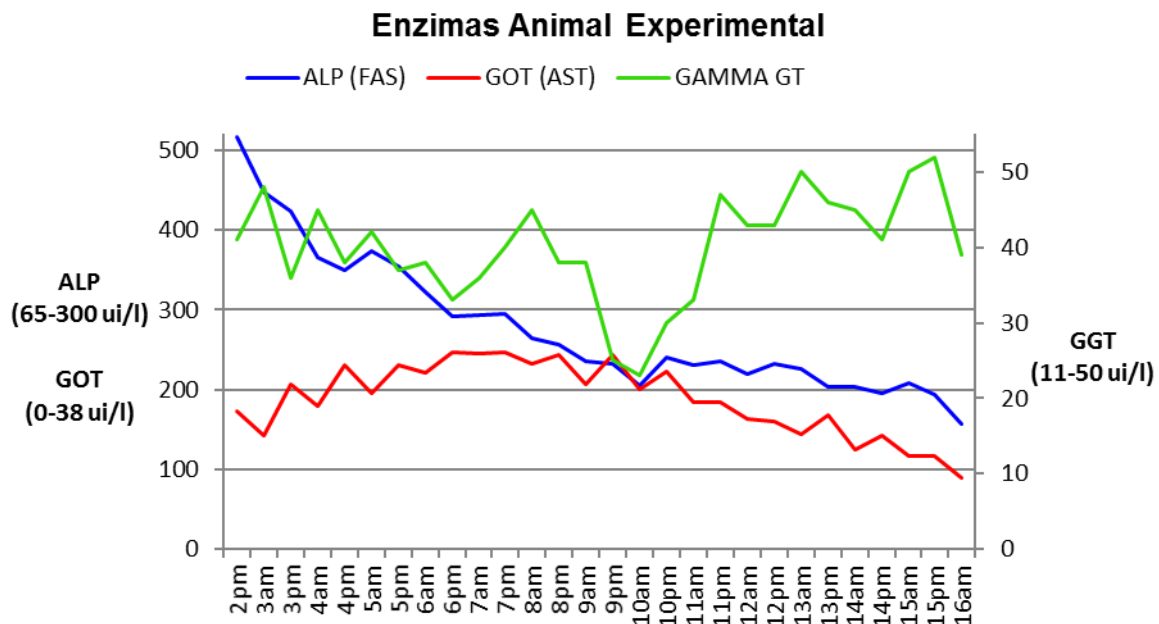


Figura 15. Evolución del perfil enzimático en el animal experimental durante el ensayo.

En los análisis bioquímicos que se realizaron en orina se encontraron como principal dato de relevancia un aumento del urobilinógeno, que comenzó a manifestarse en la segunda muestra analizada (8 de mayo), y se mantuvo elevado durante el tiempo que duró el ensayo. Por su parte, los cuerpos cetónicos se mostraron elevados en la tercera y cuarta muestra (11 y 13 de mayo respectivamente), volviendo a su valor normal al final del ensayo, evento similar a lo

ocurrido con el pH, que se manifestó levemente ácido, en el valor de 6, también en las muestras 3 y 4, y finalmente tuvo un valor de 8 (Cuadro 2).

Examen de orina Animal Experimental

PARAMETRO / FECHA	5/5	8/5	11/5	13/5	20/5
Color	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
Turbidez	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
Urobilinógeno	Norm.	++	+	++	+
Glucosa	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
C. Cetónicos	Neg.	Neg.	++	+	Neg.
Bilirrubina	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Proteína	Neg.	15	Trazas	15	15
Nitrito	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
pH	8	8	6	6	8
Sangre	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Densidad	1030	1030	1030	1030	1005
Leucocitos	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Cuadro 2. Análisis físico-químico de orina en el animal experimental.

A la necropsia, los hallazgos de mayor importancia se encontraron en el hígado. El mismo se observó discretamente firme con un pequeño foco blanquecino en estrecha proximidad con el colédoco (Fig. 16). Además, se percibió la presencia de un trasudado en cavidad abdominal, en un volumen de aproximadamente 50 ml (Fig. 17). En el resto de los órganos no se observaron lesiones.

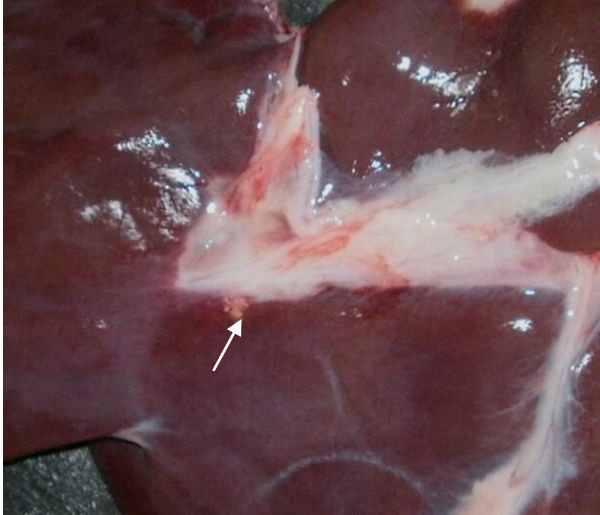


Figura 16. Pequeño foco blanquecino en hígado.



Figura 17. Trasudado en cavidad abdominal.

La histopatología reveló en el hígado una colangitis linfocítica, necrotizante (Fig. 18), con hiperplasia del epitelio canalicular (Fig. 19), leve a moderada, difusa, con exfoliación y ulceración del epitelio del canalículo (Fig. 20). Presencia de células con núcleo picnótico dentro de dicho epitelio, contenido necrótico y presencia de bilis en la luz del órgano, evidenciando estasis biliar (Fig. 18, 19 y 20). Presencia de algunos hepatocitos espumosos y degeneración hepatocítica multifocal (Fig. 21). Además, se observó una hepatitis focal, linfocítica y extensa, correspondiente a la región donde macroscópicamente se ubicaba el foco blanquecino próximo al colédoco (Fig. 22).

Las lesiones encontradas en el colédoco fueron una colecistitis linfocítica, difusa, también moderada pero muy evidente en todo el órgano (Fig. 23).

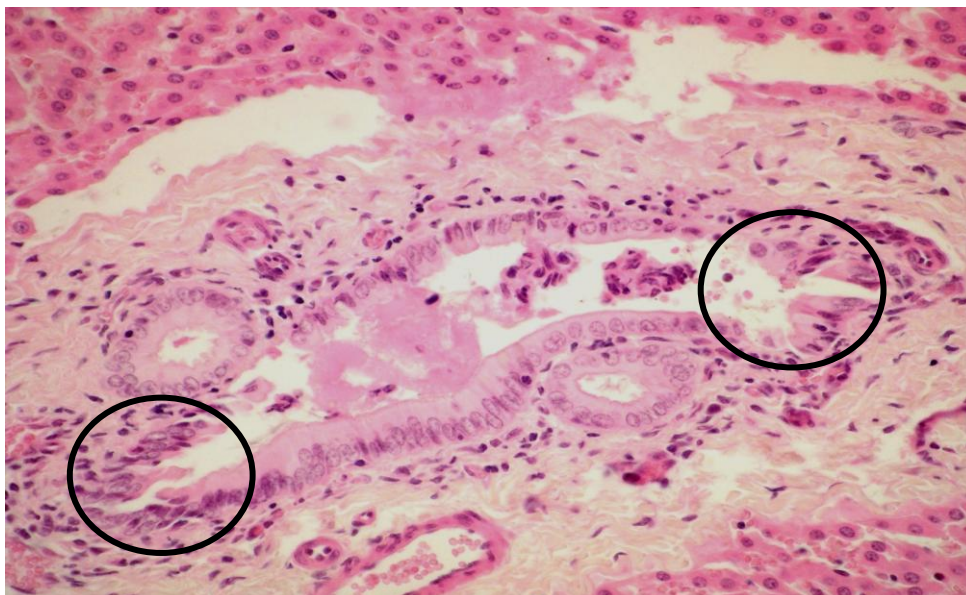


Figura 18. Colangitis linfocítica, necrotizante, hiperplásica, leve a moderada, difusa, con exfoliación de células epiteliales ductales, núcleos picnóticos y colestasis.

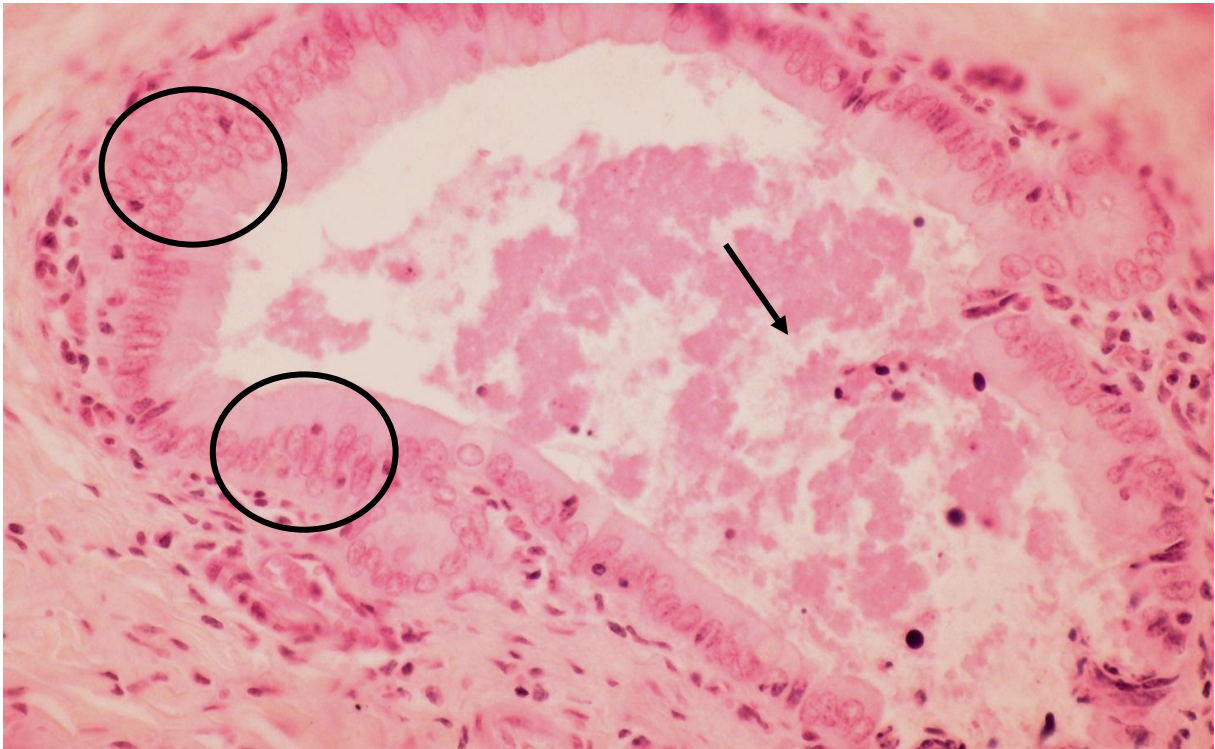


Figura. 19. Hiperplasia del epitelio canalicular (círculo) y colestasis en la luz del ducto (flecha).

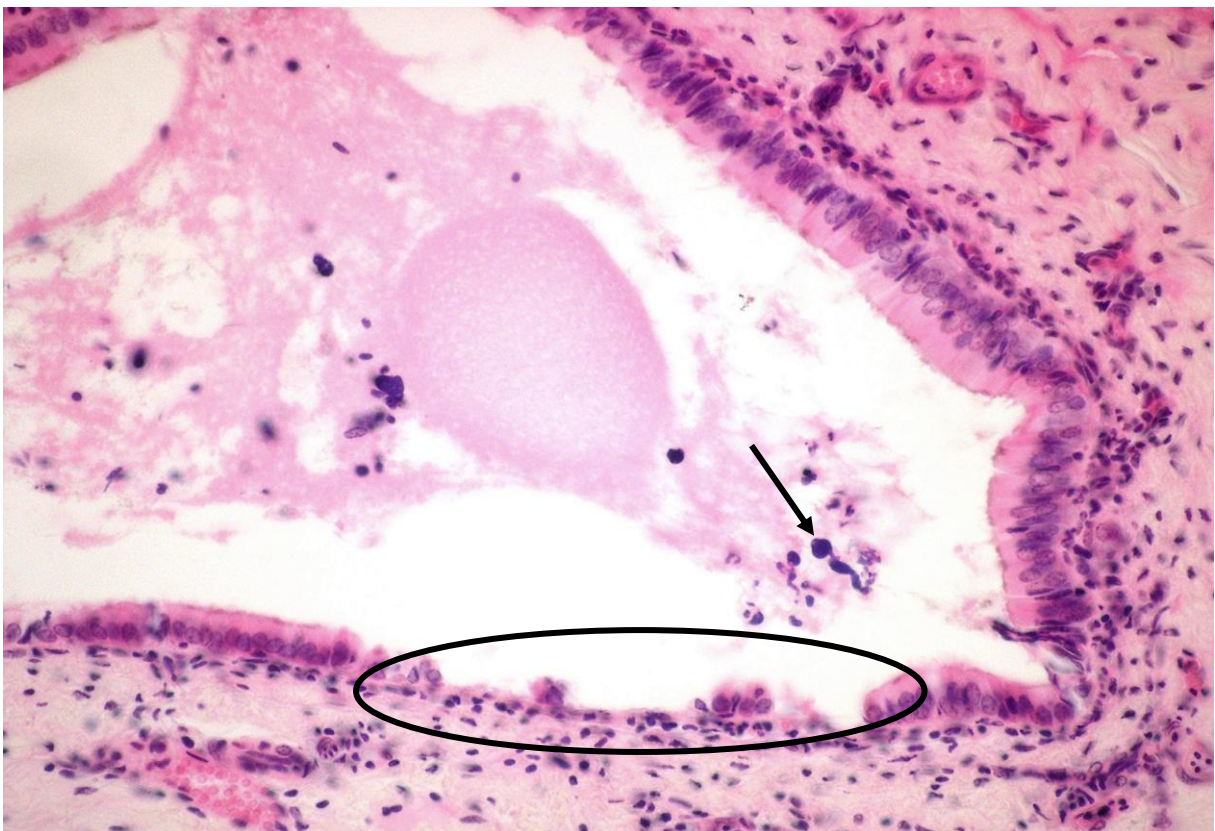


Figura 20. Ulceración del epitelio canalicular (círculo) y contenido necrótico en la luz del mismo (flecha).

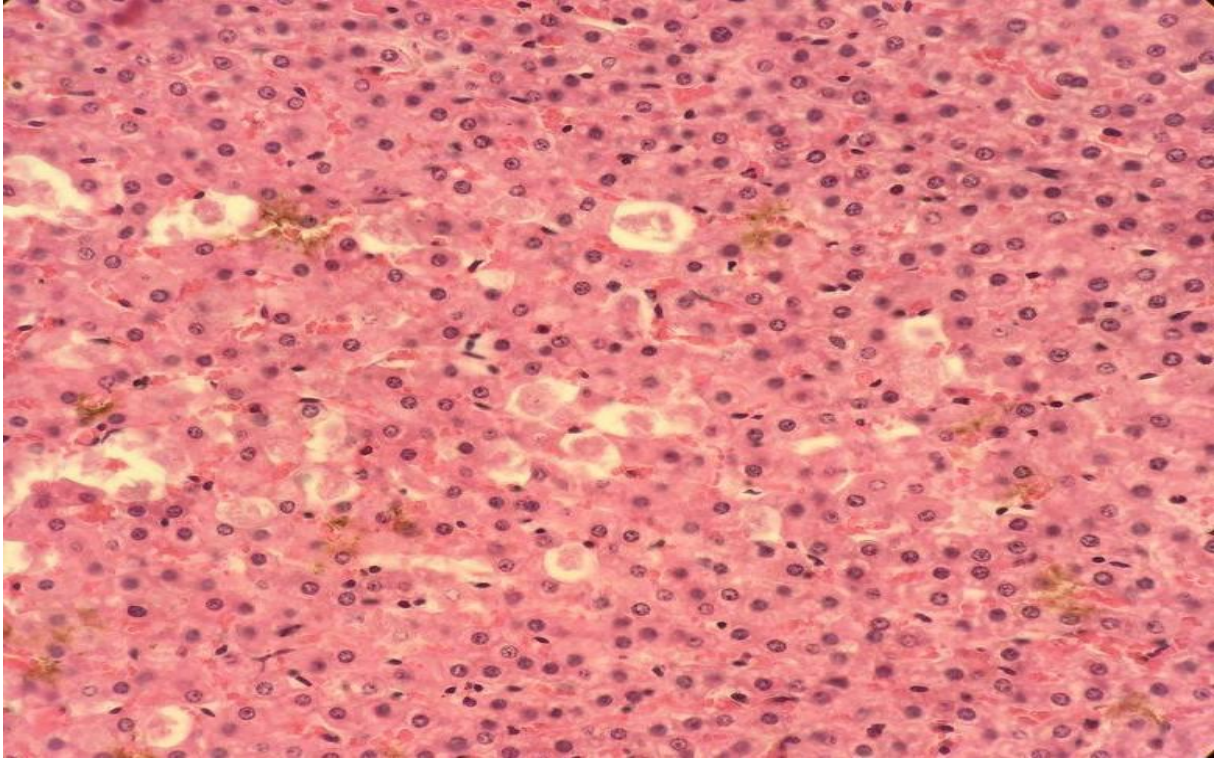


Figura 21. Degeneración hepatocítica multifocal y colestasis.

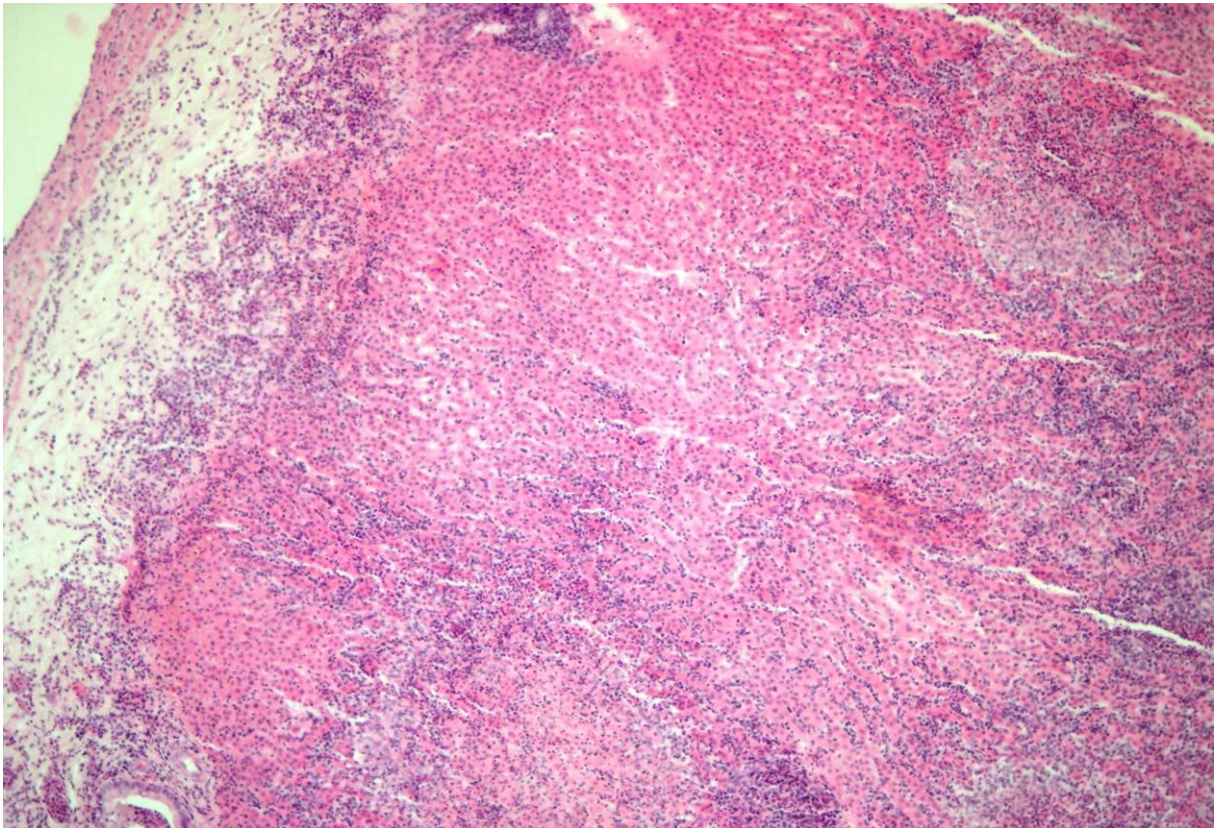


Figura 22. Hepatitis focal, extensa, linfocítica (corte correspondiente a la región donde se observó el foco blanquecino).

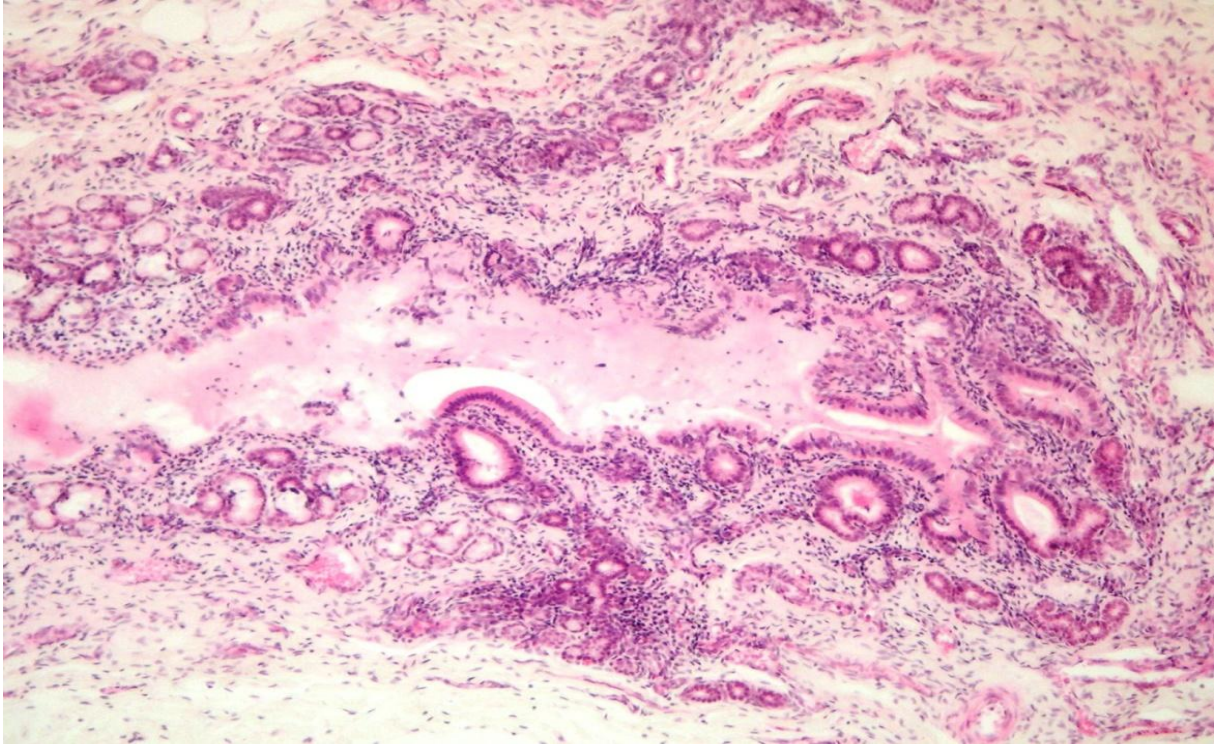


Figura. 23. Lesiones en colédoco: colecistitis, linfocítica, difusa, moderada.

En bilis del animal experimental se constató la presencia de cristales birrefringentes a la observación con microscopio de contraste de fases (Fig. 24).



Figura. 24. Presencia de cristales birrefringentes en bilis. Observación con contraste de fases.

DISCUSIÓN

Según los signos clínicos y hallazgos anatomopatológicos, la fotosensibilización que se produjo en el brote espontáneo es notoriamente de origen hepatógena. Los hallazgos encontrados en hígado fueron idénticos a los reportados en Geeldikkop (Aslani y col., 2003), en Alveld (Wisløff y col., en 2002), Dikoor (Bridges y col., 1987), fiebre de la lechuguilla (Mathews y col., 1938), Fevered (Mathews y col., 1940) o intoxicación por algunas especies de *Brachiaria* (Driemeier y col., 2002). Como en el potrero que se presentó el brote, prácticamente la única planta presente era *Euploca ocellata*, se descartaron las enfermedades antes mencionadas y se empezó a trabajar bajo la sospecha de *Euploca ocellata* como responsable de este cuadro fotosensibilizante.

Como el propósito de este trabajo fue conocer si *Euploca ocellata* fue responsable de brotes de fotosensibilización en la zona Este de nuestro país, la intoxicación experimental se realizó con un solo animal. Por lo tanto, antes de pasar a los diferentes puntos de esta discusión, no se puede obviar, que los resultados están influenciados por un factor individual, que antes de cualquier conjetura hay que tener presente.

En la reproducción experimental, la histopatología reveló una discreta, pero evidente, alteración del hígado y la presencia de cristales en bilis. No hubo síntomas de intoxicación, pero sí se observaron lesiones hepáticas. Muchas son las posibles explicaciones ante la ausencia de enfermedad clínica en la reproducción experimental.

Una inadecuada dosis diaria, justificaría los discretos resultados, pero consideramos que la dosis usada fue adecuada y se ajusta al consumo a campo. Asimismo la duración del ensayo, el tiempo empleado fue mayor al que los ovinos estuvieron expuestos a la planta en el caso espontáneo.

La pérdida de toxicidad por madurez de la planta podría explicar la ligera alteración encontrada a nivel del hígado. Ferreira y col. (2011) demostraron que las concentraciones de saponina varían según la madurez de la planta y las condiciones climáticas. En su trabajo sobre *B. brizantha* los autores notaron que las plantas jóvenes tienen mayor concentración de saponinas, y que, a medida que envejecían, las concentraciones de saponinas disminuían, probablemente esto se deba, a que

las saponinas son necesarias para la supervivencia del vegetal (Ferreira y col., 2011). En el momento que recolectamos la planta, éstas se encontraban más longevas que al momento del brote, lo que justificaría, si se confirma que *Euploca ocellata* contiene saponinas, los discretos resultados obtenidos en este trabajo. También es posible que la pérdida de toxicidad de la planta fuese por el almacenamiento de la misma (Tokarnia y col., 2000). Después de recolectar la planta, esta se almacenó en cámara de frío una semana hasta comenzar con el ensayo y durante todo el mismo.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, por lo investigado en la expuesta revisión bibliográfica, muchos son los investigadores que no han tenido éxito en el afán de reproducir experimentalmente estas Colangiopatías asociadas a cristales. La mayoría de los trabajos que investigaron estos depósitos cristaloides en el hígado se realizaron ya sea en pastoreos controlados a campo o administrando extractos de saponinas, a diferencia de lo realizado en este trabajo, que se escogió recolectar la planta en donde ocurrió el brote espontáneo, y luego procesarla antes de administrarla por vía oral al animal experimental.

Con el fin de explicar la naturaleza esporádica de este tipo de enfermedades se han desarrollado diferentes hipótesis en cuanto a su patogenia. Kellerman y col. (1991), por ejemplo, desarrollaron la posible implicación de micotoxinas de *Phitomyces chartarum* en la etiología de Geeldikkop. Mientras que Miles y col. (1994), propusieron que las variaciones en el contenido de saponina cuantitativa y cualitativa de las plantas, posiblemente en combinación con variaciones en la actividad de la flora del rumen, pueden ser responsables de las características de este grupo de enfermedades.

Algunos investigadores sugirieron también, la existencia de poblaciones de *T. terrestris* litogénicas y no litogénicas, diferencia que radica en el tipo de saponina que cada planta contenga, y que se cree, pueda estar determinada por factores genéticos (inherentes a la propia planta) o ambientales (Wilkins y col., 1996). Otros proponen, diferencias estacionales en la concentración de saponinas presentes en *T. terrestres* para explicar lo ocasional que ocurren los brotes (Wang, 1991), o como antes mencionado, diferencias de concentraciones de saponinas según la madurez de la planta y las condiciones climáticas (Ferreira y col., 2011).

Recientes estudios con *Narthecium ossifragum* han sugerido nuevas hipótesis sobre la patogenia de Alved (Fláoyen y Frosli, 1997; Mysterud y col., 2007; Mysterud y col., 2016). Una de ellas es la teoría de un microorganismo cofactor, (desconocido), que debido a su presencia en la planta, ésta origina metabolitos tóxicos (Mysterud y col., 2007). La otra hipótesis es la producción secundaria de fitoalexinas (antimicrobianos que se acumulan en algunas hierbas) por parte de las plantas, debido a esporas de hongos o algún otro agente que produzca un estrés en la misma (Fláoyen y Frosli, 1997). Se estudiaron diversas especies de bacterias, virus, protozoarios, hongos, y otros parásitos, estas investigaciones en Alved han culminado sin encontrar ningún “candidato” responsable de la enfermedad (Pollock y col., 2015). Muchas son las teorías que se han desarrollado para esclarecer la eventualidad con la que se producen estos brotes, alguna de estas hipótesis podrían explicar, por qué no se logró causar la enfermedad clínica en la reproducción experimental.

Para llegar a un diagnóstico etiológico, es necesario observar la lesión característica ligada al agente etiológico (Dutra, F. comunicación personal, 2015). En este ensayo se notó una pericolangitis, la presencia de macrófagos espumosos en el hígado, cristales en bilis, pero no se apreció la presencia de los cristales bloqueando los conductos biliares, tal como se observó en el caso espontáneo y que hubiese confirmado la enfermedad. Así, en el supuesto que los cristales sean el agente causante de obstrucción canalicular y de daño epitelial ductal, en el presente ensayo no se llegó al diagnóstico etiológico definitivo.

Sin embargo, algunos autores afirman que es posible que los cristales se disuelvan en el proceso de parafinado, por lo que el hallazgo frecuente serian grietas aciculares en donde se encontraban los mismos (Kelly, 1993), en este trabajo no se evidenció este hallazgo, posiblemente por lo discreto que fue el daño canalicular. En tanto que otros investigadores sugieren que el daño hepático se produce antes que la obstrucción de los ductos biliares y que los cristales birrefringentes son simplemente consecuencia de la alteración primaria del parénquima hepático. (Flåøyen y col., 1999; Wisløff y col., en 2002). Esto podría justificar el ligero aumento de la AST y la discreta pericolangitis que se manifestó en esta investigación en el caso experimental. Este concepto abre nuevas hipótesis, sobre el origen del posible daño hepático causante de esta enfermedad.

Esperamos que este trabajo pueda abrir puertas a futuras investigaciones sobre el tema, que puedan esclarecer el origen de estos brotes de fotosensibilización en la región este de nuestro país.

CONCLUSIÓN

Si bien no se reprodujo experimentalmente la enfermedad clínica, los resultados obtenidos indican que *Euploca ocellata* (Cham.) ocasiona lesión hepática en los ductos biliares, con formación de cristales en la bilis, muy similar a los casos espontáneos y posiblemente sea la causa de los brotes de intoxicación en ovinos en el Este de Uruguay.

Se requieren nuevas investigaciones con más animales y diferentes protocolos experimentales para confirmar definitivamente esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aslani, M. R., Movassaghi, A. R., Mohri, M., Pedram, M., Abavisani, A. (2003). Experimental *Tribulus terrestris* poisoning in sheep: clinical, laboratory and pathological findings. *Vet. Res. Com.*, 27(1):53-62.
2. Assis, T. S., Medeiros, R. M., Riet-Correa, F., Galiza, G. J., Dantas, A. F., Oliveira, D. M. (2010). Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, 30(1):13-20.
3. Badiei, K., Mostaghni, K., Nazifi, S., Tafti, A. K., Ghane, M., Momeni, S. A. (2009). Experimental *Panicum miliaceum* poisoning in sheep. *Small Ruminant Res.*, 82(2):99-104.
4. Blunden, G., Cripps, A. L., Jewers, K. (1980). Ruizgenin, a new steroidal sapogenin diol from *AgaveLecheguilla*. *Steroids*, 35(5):503-510.
5. Bonino, J. A., Leguisamo, E., Albanell Aguirrezabala, S. (2013). Estudio de la toxicidad de *Nerium oleander* en ovinos. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 55p.
6. Bridges, C. H., Camp, B. J., Livingston, C. W., Bailey, E. M. (1987). Kleingrass (*Panicum coloratum* L.) poisoning in sheep. *Vet Pathol Online*, 24(6):525-531.
7. Brum, K. B., Haraguchi, M., Lemos, R. A., Riet-Correa, F., Fioravanti, M. C. S. (2007). Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesq. Vet. Bras.*, 27(1):39-42.
8. Castro, M. B., Santos Jr, H. L., Mustafa, V. S., Gracindo, C. V., Moscardini, A. C. R., Louvandini, H., Riet-Correa, F. (2011). *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings. *Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins*. London, CAB International, p 110-117.
9. Catasús, L. (1997). *Manual de Agrostología*. Habana, Academia, 98 p.
10. Cheeke, P.R. (1996). Biological effects of feed and forage saponins and their impact on animal production. En: Waller G.R., Yamasaki K. (1996) *Advances in Experimental Medicine and Biology.: Saponins Used in Food and Agriculture*. New York, Springer, p 377-385.

11. Costa, E. F., Streitenberger, N., Barberon, J., Zeinstege, P., Fazzio, L. E. (2014). Intoxicación por *Cestrum parqui* ("duraznillo negro") en bovinos. Confirmación por análisis micrográfico del contenido ruminal. *Rev Vet*, 25(1):45-49.
12. Costa RA, Da Fonseca JM, Paiva I. (2014). Intoxicación experimental por *Vernonia plantaginoides* (less.) Hieron en ovinos". Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 49p.
13. De Oliveira, C. H. S., Barbosa, J. D., Oliveira, C. M. C., Bastianetto, E., Melo, M. M., Haraguchi, M., Leite, R. C. (2013). Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. *Toxicon*, 73:121-129.
14. Dutra, F., Romero, A., Quinteros, C., Araújo, R., y García y Santos, C. (2016). Poisoning of sheep by *Vernonia plantaginoides* (Less.) Hieron in Uruguay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 28(4): 392-398.
15. Dutra, F. (2015). Geeldikopp o colangiopatía por cristales en corderos. *Archivo Veterinario del Este*. Publicación trimestral del Laboratorio Regional Este de DILAVE "Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) Uruguay. Boletín en Internet, 24: 10-12.
16. Dutra, F. (2013) Patología ovina de la última década en Uruguay. Primer Congreso Internacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, 9.
17. Driemeier, D., Colodel, E. M., Seitz, A. L., Barros, S. S., Cruz, C. E. (2002). Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon*, 40(7):1027-1031.
18. Ferreira, M. B., Brum, K. B., Fernandes, C. E., Martins, C. F., Pinto, G. S., Castro, V. S., Rezende, K. G., Riet-Correa, F., Haraguchi, M., Wysocki, H. L., Lemos, R. A. A. (2011). Variation in saponin concentration in *Brachiaria brizantha* leaves as a function of maturation: preliminary data. 8th International Symposium on Poisonous Plants (ISOPP8), João Pessoa, Paraíba, Brazil, p. 118-123.
19. Flåøyen, A., Handeland, K., Stuve, G., Ryeng, K. A., Refsum, T. (1999). Experimental *Nartheccium ossifragum* nephrotoxicity in cervids from Norway. *J Wildl Dis*, 35(1):24-30.

20. Flåøyen, A., Wilkins, A. L. (1997). Metabolism of saponins from *Narthecium ossifragum*-a plant implicated in the etiology of alveld, a hepatogenous photosensitization of sheep. *Vet. Res. Com.*, 21(5):335-345.
21. Flåøyen, A., Frosli, A. (1997). Photosensitization Disorders. En: D'Mello, J.P.F. *Handbook of plant and fungal toxicants*, Boca Ratón, CRC, 191-204..
22. Flåøyen, A., Tønnesen, H. H., Grønstøl, H., Karlsen, J. (1991). Failure to induce toxicity in lambs by administering saponins from *Narthecium ossifragum*. *Vet. Res. Com.*, 15(6):483-487.
23. García y Santos C, Capelli A. (2016). Intoxicaciones por plantas y micotoxinas diagnosticadas en rumiantes en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 52(201): 28-42.
24. García y Santos C, Pereira R, Etcheberry G, Goyen JM, Pérez W, Capelli A, Alonso E, Ruiz-Díaz A, Riet-Correa F. (2012). Enzootic calcinosis caused by *Nierembergia rivularis* in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24:423-426.
25. García y Santos C, Pereira R, Capelli A, Domínguez R, Bonino F, Goyen JM, Arago S. (2007). Intoxicación espontánea en ovinos por ingestión de *Solanum glaucophyllum* (malacoxylon) en Uruguay. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay pp. 284-285.
26. Gracindo, C. V., Louvandini, H., Riet-Correa, F., Barbosa-Ferreira, M., de Castro, M. B. (2014). Performance of sheep grazing in pastures of *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. *Trop Anim Health Prod*, 46(5):733-737.
27. Guglieri, A., Zuloaga, F. O., Longhi-Wagner, H. M. (2004). Synopsis of *Panicum* subg. *Panicum* (Poaceae, Paniceae) in Brazil. *Acta Bot Bras*, 18(2):359-367.
28. Häfliger, E., Scholz, H. (1980).. Grass weeds, 1 weeds of the subfamily Panicoideae. Basel, Documenta CIBA-GEIGY, 142 p.
29. Iriarte M.E, Lauber MN, Mattos JJ. (2011). Estudio de la toxicidad de *Phytolacca dioica* (ombú) en ovinos. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 30p
30. Izco J., Barreno E., Brugués M. (2004) *Botánica*, 2º ed., Madrid, McGraw-Hill Interamericana, 920 p.

31. James, L. F. (1994). Solving poisonous plant problems by a team approach. En: Colegate S.M, Dorling P.R. Plant Associated Toxins. Wallingford, CAB International, pp.1-6.
32. James, L. F., Nielsen, D. B., Panter, K. E. (1992). Impact of poisonous plants on the livestock industry. J Range Manag, 45:3-8.
33. Kellerman, T. S., Erasmus, G. L., Coetzer, J. A., Brown, J. M. M., Maartens, B. P. (1991). Photosensitivity in South Africa. VI. The experimental induction of geeldikkop in sheep with crude steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. Onderstepoort J. Vet. Res. 58:47-53.
34. Kellerman, T. S., Van der Westhuizen, G. C., Coetzer, J. A., Roux, C., Marasas, W. F., Minne, J. A., Bath, G.F., Basson, P. A. (1980). Photosensitivity in South Africa. II. The experimental production of the ovine hepatogenous photosensitivity disease geeldikkop (*Tribulosis ovis*) by the simultaneous ingestion of *Tribulus terrestris* plants and cultures of *Pithomyces chartarum* containing the mycotoxin sporidesmin. Onderstepoort J Vet. Res., 47(4):231-261.
35. Kelly, W. R. (1993). The liver and the biliary system. En: Jubb, K.B.F., Kennedy, P. C., Palmer, N. Pathology of domestic animals. 4^a ed. London, Academic, V. 2, p. 319-406.
36. Machado, R., Mesa, A. R., Milera, M., Santana, H., Ojeda, A. (1989). Instructivo técnico para la siembra, manejo y producción animal de la *Brachiaria*. Perico, Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", 7 p.
37. Mathews, F. P. (1938). Lechuguilla (*Agave lechuguilla*) poisoning in sheep and goats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 93: 168-175.
38. Mathews, F. P. (1940). Poisoning in sheep and goats by sacahuiste (*Nolina texana*) buds and blooms. Bull. Tex. Agric. Exp. Stn., 585:5-19.
39. Miles, C. O., Wilkins, A. L., Erasmus, G. L., Kellerman, T. S. (1994). Photosensitivity in South Africa. VIII. Ovine metabolism of *Tribulus terrestris* saponins during experimentally induced geeldikkop. Onderstepoort J Vet. Res., 61:351-359.
40. Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, S. C., Flaoyen, A., Holland, P. T., Smith, B. L. (1993). Identification of insoluble salts of the beta-D-glucuronides of episarsasapogenin and epismilagenin in the bile of lambs with alveld and

- examination of *Nartheccium ossifragum*, *Tribulus terrestris*, and *Panicum miliaceum* for sapogenins. *J Agric Food Chem*, 41(6):914-917.
41. Miles, C. O., Munday, S. C., Holland, P. T., Lancaster, M. J., Wilkins, A. L. (1992). Further analysis of bile crystals from sheep grazing *Panicum schinzii* (sweet grass). *Australian Vet J*, 69(2):34-34.
 42. Miles, C. O., Munday, S. C., Holland, P. T., Smith, B. L., Embling, P. P., Wilkins, A. L. (1991). Identification of a sapogenin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *New Zeal. Vet J*, 39 (4):150-152.
 43. Miranda J.I., Semir J. (2009). Two new Brazilian species and new combinations in *Euploca*. *Kew Bull*, 64:285-289.
 44. 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.*
 45. Munday, S. C., Wilkins, A. L., Miles, C. O., Holland, P. T. (1993). Isolation and structure elucidation of dichotomin, a furostanol saponin implicated in hepatogenous photosensitization of sheep grazing *Panicum dichotomiflorum*. *J Agric Food Chem*, 41(2):267-271.
 46. Mysterud, I., Koller, G., Høiland, K., Carlsen, T., Sletten, A. (2016). The lamb disease alveld: Search for fungi and bacteria on *Nartheccium ossifragum* foliage and roots. *Small Rum Res.*, 136:179-186.
 47. Mysterud, I., Flåøyen, A., Loader, J. I., & Wilkins, A. L. (2007). Sapogenin levels in *Nartheccium ossifragum* plants and *Ovis aries* lamb faeces during two alveld outbreaks in Møre og Romsdal, Norway, 2001. *Vet. Res. Commun.*, 31(7): 895-908.
 48. Odriozola, E. R., Lloberas, M., Cantón, G. J., Costa, E. F., Campero, C. M. (2009). Fotosensibilización Espontánea Por Consumo de Mijo (*Panicum Miliaceum* L.) En Terneras. *Rev. Med. Vet. (B. Aires)*, 90(3/4): 57-60.
 49. Perusia, O.R., Rodriguez, A.R. (2004) *Plantas y Micotoxinas*. Santa Fe. Laboratorios Allignan. 117p.
 50. Petersen, J. L., Ueckert, D. N. (1992). *Nolina texana* control with soil-applied herbicides. *Weed Technol*, 6(4):904-908.

51. Pollock, M. L., Wishart, H., Holland, J. P., Malone, F. E., Waterhouse, A. (2015). Photosensitisation of livestock grazing *Nartheccium ossifragum*: Current knowledge and future directions. *Vet J*, 206(3):275-283.
52. Puoli, J. R., Reid, R. L., Belesky, D. P. (1992). Photosensitization in lambs grazing switchgrass. *Agron J*, 84(6):1077-1080.
53. Riet Alvariza F, Moyna P, Del Puerto O, Perdomo E, Baraibar M, Parada H, Pasquariello. (1979). Intoxicación por duraznillo negro en el bovino. VII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. Sección cc 3, pp. 1-8.
54. Riet-Correa, B., Castro, M. B., Lemos, R. A., Riet-Correa, G., Mustafa, V., Riet-Correa, F. (2011). *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 31(3):183-192.
55. Riet-Correa F, Barros SS, Méndez MC, Gevehr-Fernandes C, Pereira Neto OA, Soares MP, McGavin MD. (2009a). Axonal degeneration in sheep caused by the ingestion of *Halimium brasiliense*. *J Vet Diagn Invest* 21:478–486.
56. Riet-Correa F., Haraguchi M., Dantas A.F.M., Burakovas R.G., Yokosuka A., Mimaki Y., Medeiros R.M.T., Matos P.F. (2009b). Sheep poisoning by *Panicum dichotomiflorum* in northeastern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 29 (1): 94-98.
57. Riet-Correa F., Schild, AL., Lemos, R.A.A., Borges., J.R. (2007). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 2ª ed. Santa María, Pallotti; pp. 99 - 219.
58. Riet-Correa, F., Medeiros, R. M. (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):38-42.
59. Riet-Correa, F., Méndez, M. D. C., Riet-Correa, F., Méndez, M. C., Schild, A. L. (1993). Introdução ao estudo das plantas tóxicas. *Intoxicações por Plantas e Micotoxinas em Animais Domésticos*. Pelotas, Hemisfério Sul do Brasil, 340p.
60. Rissi, D. R., Rech, R. R., Pierezan, F., Gabriel, A. L., Trost, M. E., Brum, J. S., Kommers, G.D., Barros, C. S. (2007). Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. *Pesq. Vet. Bras*, 27(7): 261-268.
61. Rivero, R., Riet-Correa, F., Dutra, F., Matto, C. (2011a). Toxic plants and mycotoxins affecting cattle and sheep in Uruguay. En: Riet-Correa, F., Pfister,

- J., Schild, AL, Wierenga, TL. Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins. Cambridge. CAB International, pp. 25-34.
62. Rivero R, Giannechini E, Matto C, Gil J. (2011b). Intoxicación por *Lantana camara* en bovinos y ovinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 47:29-34.
63. Rivero R, Zabala A, Giannechini E, Gil J, Moraes J. (2001). *Anagallis arvensis* poisoning in cattle and sheep in Uruguay. *Vet Hum Toxicol* 43:27-30.
64. Rivero R, Quintana S, Féola R, Haedo F. (1989). Principales enfermedades diagnosticadas en el área de influencia del laboratorio de Diagnóstico Regional Noroeste del C.I. Vet. Miguel C. Rubino. XVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, Sección I, pp. 1-73.
65. Romero, A., Quinteros, C. D., Dutra, F. (2013) Lesiones neurológicas en casos espontáneos de intoxicación por *Ramaria Flavo-Brunnescens* en ovinos. XLI Jornadas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p. 160-161.
66. San Andrés, M. I., Couto, R. J., Moreno, E. B. (2000). Toxicología animal originada por plantas:(flora silvestre española). Madrid, Editorial Complutense, 272 p.
67. Scheie, E., Flåøyen, A., Moan, J., Berg, K. (2002). Phylloerythrin: Mechanisms for cellular uptake and location, photosensitisation and spectroscopic evaluation. *New Zealand Vet. Journal*, 50(3):104-110.
68. Smith, B. L. (2000). Effects of low dose rates of sporidesmin given orally to sheep. *New Zeal. Vet. J*, 48(6):176-181.
69. Stannard, A. A. (2006). Moléstias da pele—dermatopatias. En: Smith, B.P. Tratado de Medicina de Grandes Animais. São Paulo, Manole, pp. 1231-1232.
70. Villar, D., Díaz, J. J. O. (2006). Plantas tóxicas de interés veterinario. Barcelona, Masson, 208 p.
71. Tokarnia C.H., Döberenier J., Peixoto P.V. (2000) Plantas tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro, Heliantos, 320p.
72. Wall, M. E., Warnock, B. H., Willaman, J. J. (1962). Steroidal sapogenins. LXVIII. Their occurrence in *Agave lecheguilla*. *Econ. Bot.*, 16(4):266-269.
73. Wang, Y. (1991). Study on the quantitative analysis for the saponin in *Tribulus terrestris* L. *Chinese J. Pharm. Anal.*, 11(2), 70-72.
74. Wilkins, A. L., Miles, C. O., De Kock, W. T., Erasmus, G. L., Basson, A. T., Kellerman, T. S. (1996). Photosensitivity in South Africa. IX. Structure elucidation of a beta-glucosidase-treated saponin from *Tribulus terrestris*, and

the identification of saponin chemotypes of South African *T. terrestris*. Onderstepoort J Vet. Res., 63(4), 327-334.

75. Wina, E., Muetzel, S., Becker, K. (2005). The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. J Agric Food Chem, 53(21):8093-8105.

76. Wisløff, H., Wilkins, A. L., Scheie, E., Flåøyen, A. (2002). Accumulation of sapogenin conjugates and histological changes in the liver and kidneys of lambs suffering from alveld, a hepatogenous photosensitization disease of sheep grazing *Nartheicum ossifragum*. Vet. Res. Com., 26(5):381-396.