

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

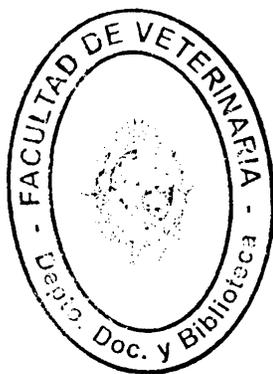
Intoxicación por *Nierembergia rivularis* en ovinos de Uruguay

por

**ETCHEBERRY CARRASCO, Gabriel Pedro
GOYEN LINARES, Juan Martín
PEREIRA DÍAZ, Rodrigo Agustín**

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

MODALIDAD Ensayo Experimental



**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

109 TG
Intoxicación po
Etcheverry, Gabriel Pedro



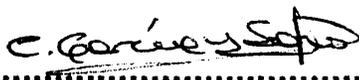
PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

.....

Dr. Jorge Bonino

Segundo Miembro (Tutor):


.....

Dra. Carmen García y Santos

Tercer Miembro:

.....

Fecha: 30/12/2008
.....

Autores:


.....

Gabriel Pedro Etcheberry Carrasco

.....

Juan Martin Goyén Linares

.....

Rodrigo Agustín Pereira Díaz

**A nuestras respectivas familias que han hecho posible
que hoy estemos dedicándoles este trabajo final.**

**A todos y cada uno de los que contribuyeron en
la realización de esta Tesis.**

**A toda la gente que de cierta manera influyó durante
toda nuestra carrera y vida como estudiantes de
la gran Facultad de Veterinaria.**

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Carmen García y Santos, por darnos la oportunidad de realizar este trabajo, por habernos guiado, enseñado, brindado su tiempo y apoyo así como también por habernos soportado durante largas jornadas de planificación y realización de todo este trabajo. Muchísimas gracias.
- Al Br. William Pérez por ayudarnos de forma invaluable durante el transcurso de todo este trabajo.
- Al Botánico Eduardo Alonso, por habernos ayudado y enseñado tanto y de manera desinteresada y por estar siempre con una disposición admirable para el trabajo.
- Al Sr. Jesús Pinheiro por su constante e invaluable apoyo en la realización de la reproducción experimental, así como por su ayuda totalmente desinteresada en todo lo que fuera necesario. Muchísimas gracias.
- Al Br. Federico Bonino, por habernos ayudado de forma desinteresada y con la mejor disposición.
- A CSIC, ya que sin la ayuda financiera brindada este trabajo no hubiera sido posible.
- Al Prof Heinzen y al químico Alejandro Ruiz-Díaz por su ayuda en todo lo concerniente a análisis químicos.
- Al Dr. Pedro Martino, Dra. María Ines Pisón y a todo el personal de análisis clínicos y radiología por ayudarnos tan desinteresadamente.
- Al Dr. Rodolfo Rivero por la realización de la histopatología y al Dr. Jorge Moraes.

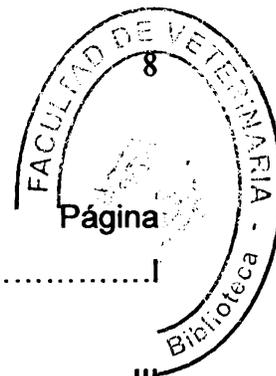
- Al Dr. Antonio Moraña por su ayuda en diversas partes de este trabajo.
- A los Dres. Alvaro Seonae y Mónica Rodríguez por haber no solo comunicado el caso sino también por ayudarnos a que la reproducción experimental se llevara a cabo.
- Al Sr. José Mario Da Cunha hijo y familia por habernos abierto las puertas a su establecimiento y por su ayuda en el monitoreo y control de los animales durante el experimento. Sin ellos, este trabajo no hubiera sido posible.
- A la familia Pereira Díaz por brindarnos su ayuda durante todo el transcurso del experimento.
- Al Ing. Agr. Juan Ignacio Etcheberry del INIA Tacuarembó por su ayuda en la realización del proyecto.
- A todos nuestros compañeros y amigos que de una forma u otra han dejado su marca durante toda esta preciosa vida de estudiantes.
- A nuestras familias, por su incondicional apoyo y por hacer posible el llegar a esta etapa de nuestras vidas.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1: Distribución del calcio iónico (Ca^{++}) del calcio difusible pero no ionizado (Ca_x), y del proteinato cálcico no difusible (Ca prot) en el plasma sanguíneo	7
Figura 2: Zona baja del potrero problema donde se comprobó la presencia de planta	27
Figura 3: <i>Nierembergia rivularis</i>	28
Figura 4: Cerco eléctrico para control de pastoreo	29
Figura 5: Evolución del peso vivo de los animales durante el período de experimentación	30
Figura 6: Evolución de los niveles de calcio sérico de los animales durante el período de experimentación	31
Figura 7: Evolución de los niveles de fósforo de los animales durante el período de experimentación	31
Figura 8: Relación Ca/P	32
Figura 9: Radiografía de uno de los ovinos afectados	32
Figura 10: Ecografía de riñón izquierdo de uno de los animales afectados ...	33
Figura 11: Aorta comparada	34
Figura 12: Focos de calcificación en arteria (100x)	35
Figura 13: Calcificaciones y células gigantes (400x)	36
Figura 14: Estomas de <i>N. rivularis</i> (400x)	36

Figura 15: Tricomas de <i>N. rivularis</i> (400x)	37
Figura 16: TLC revelada con sulfato de cobre	37
Figura 17: TLC revelado con luz UV a 254 nm	38

TABLA DE CONTENIDO



<u>PÁGINA DE APROBACIÓN</u>	I
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	III
<u>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</u>	v
1. <u>RESUMEN</u>	1
1. <u>SUMMARY</u>	2
2. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
3. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
3.1 IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS TÓXICAS EN URUGUAY	5
3.2 PLANTAS CALCINOGENICAS	6
3.3 METABOLISMO DEL CALCIO Y FOSFORO	6
3.4 FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA VITAMINA D	9
3.5 CALCINOSIS ENZOOTICA	11
3.5.1 Concepto	11
3.5.2 Etiopatogenia	11
3.5.3 Epidemiología	12
3.5.4 Importancia económica	13
3.5.5 Signos clínicos	13
3.5.6 Patología	14
3.5.7 Diagnóstico	15
3.5.8 Control y profilaxis	16
3.6 INTOXICACION POR <i>Nierembergia veitchii</i> en ovinos	17
3.6.1 Descripción botánica del género	17
3.6.2 Factores epidemiológicos	19
3.6.2.1 Dependientes del animal	19
3.6.2.2 Dependientes de la planta	19
3.6.2.3 Relacionados al medio ambiente	19

3.6.3 Signos clínicos	20
3.6.4 Patología	20
3.6.5 Diagnóstico	22
3.6.6 Control	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	24
5.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	24
5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	25
5.4 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO CLÍNICO	26
5.5 ANÁLISIS MICROHISTOLÓGICO	26
5.6 DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS	27
6. RESULTADOS	27
6.1 EPIDEMIOLÓGICOS	27
6.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA	28
6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	29
6.4 DATOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS	30
6.4.1 Datos clínicos	30
6.4.2 Lesiones macroscópicas.....	33
6.4.3 Lesiones histológicas	35
6.5 ANÁLISIS MICROHISTOLÓGICO	36
6.6 ANÁLISIS QUÍMICO	37
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
10. ANEXO	50

1. RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la toxicidad de *Nierembergia rivularis*, a partir de un brote natural de calcinosis enzoótica de etiología incierta. Se utilizaron cuatro ovinos, Corriedale, de 20Kg de peso vivo promedio. Tres de ellos, fueron sometidos a un pastoreo controlado en un potrero donde estaba presente la planta en estudio. El restante, usado como testigo, pastoreó un potrero del mismo predio, libre de *N. rivularis*. Los animales sometidos al consumo de planta, no presentaron signos clínicos evidenciables, a no ser que fueran sometidos a esfuerzo físico intenso. Durante el período de experimentación se tomaron muestras de sangre para evaluar calcemia y fosfatemia, así como materia fecal para análisis microhistológico. A los 90 días de comenzado el diseño experimental, se realizó necropsia de los cuatro animales, observándose alteraciones macroscópicas compatibles con calcinosis enzoótica, no así en el testigo. Histológicamente se evidenciaron lesiones de mineralización y fragmentación de capa media e íntima en arterias, con presencia de células gigantes. La cromatografía en capa fina, reveló existencia de vitamina D3 o alguna de sus variantes en el extracto clorofórmico. En base a los datos clínicos, hallazgos macroscópicos, histopatológicos, microhistológicos y químicos, podemos afirmar que *Nierembergia rivularis* es tóxica para los ovinos en Uruguay.

1. SUMMARY

In this work toxicity of *Nierembergia rivularis* was studied from a natural case of uncertain aetiology. Four Corriedale sheep were used, weighing 20Kg. Three were forced to graze where the study plant was present. The fourth, was used as a witness, grazed in an area in the same place free of *Nierembergia rivularis*. The animals under plant grazing conditions did not show evident clinical signs unless they were forced to an intense effort. During the experiment, blood samples were collected in order to evaluate calcium and phosphorous serum levels, as well as samples of faeces for microhistological analysis. At day 90 of the experiment, the four animals were slaughtered in order to perform a necropsy. Macroscopic alterations were observed in three of them except in the witness that were compatible with enzootic calcinosis. Histological findings consisted in mineralization and fragmentation of the media and intima's layer of various arteries, as well as giant cells. The thin layer chromatography revealed the existence of vitamin D₃ or one of its variables in the chloroform extract. Based on the clinical data, anatomical, histological and microhistological findings, as well as chemical results, we can asseverate that *Nierembergia rivularis* is a toxic plant for sheep in Uruguay.

2. INTRODUCCIÓN

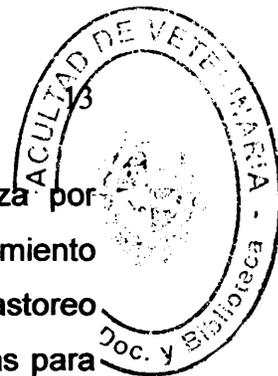
Las intoxicaciones por plantas son un problema importante en bovinos y ovinos en condiciones de pastoreo en todo el mundo. Constituyen una permanente preocupación entre los profesionales implicados en el tema (Rivero y col., 2000; Riet-Correa y Medeiros, 2001).

Además del riesgo para la salud humana, las plantas tóxicas ocasionan importantes pérdidas económicas para el sector agropecuario del país y la región (Rivero y col., 2000; Riet-Correa y Medeiros, 2001; Riet-Correa y Rivero, 2005).

En Uruguay, hasta el momento son conocidas 31 especies tóxicas, pertenecientes a 26 géneros, siendo las más importantes las meteorógenas *Trifolium repens* y *T. pratense*, *Senecio* spp, *Cestrum parqui*, plantas nefrotóxicas, neurotóxicas y calcinogénicas (Rivero y col., 2000).

La ingestión de plantas calcinogénicas, produce una intoxicación crónica en ruminantes y equinos, conocida como calcinosis enzoótica (Gimeno, 2000). Los principios de estas plantas, han sido identificados como glucósidos 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol o Vitamina D) o metabolitos derivados del mismo. Estos producen un desbalance del metabolismo del calcio y fósforo (Wasserman, 1975; Mello y Habermehl, 1998).

Entre las plantas calcinogénicas, *Solanum glaucophyllum*, ha sido ampliamente estudiada en la región y en Uruguay (Carrillo y Worker, 1967; Camberos y Davis, 1969; Riet-Correa y col., 1975; Gimeno, 1977; Rivero y col., 1989, García y Santos y col., 2007) y *Nierembergia veitchii* en Brasil (Barros y col., 1970; Riet-Correa y col., 1987; Riet-Correa y col., 1993b; Rissi y col., 2007).



El curso clínico de la enfermedad es crónico y se caracteriza por dificultad en la locomoción, anorexia, pérdida de peso, emagrecimiento progresivo y xifosis. Esto ocasiona un deterioro físico en animales en pastoreo y depreciación de las reses, causando importantes pérdidas económicas para los productores. Los ovinos pueden morir súbitamente al ser movilizados (Camberos y Davis, 1969; Döbereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Gimeno, 1977; Gimeno, 2000).

Las lesiones macroscópicas de los animales intoxicados son endurecimiento y pérdida de elasticidad de arterias, excepto las pulmonares, mineralizaciones en corazón, aorta y otras arterias, pulmones, tendones, cartílagos articulares y ligamentos (Eckell y col., 1960; Döbereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Riet-Correa y col., 1993b; Barros y Gimeno, 2000; Gimeno, 2000; Barros y col, 2006).

Microscópicamente se observan áreas de mineralización von Kossa positivas, en la capa media de las arterias, con fragmentación de las fibras elásticas, presencia de infiltrados de macrófagos y de células gigantes multinucleadas (Barros y col., 1970; Döbereiner y col., 1971; Tokarnia y Döbereiner, 1974; Riet-Correa y col., 1987; Rivero y col., 1989; Gimeno, 2002; Barros y col., 2006).

El objetivo de este trabajo es estudiar la intoxicación por *N. rivularis* (*N. repens*) en ovinos del norte del país, caracterizando la epidemiología, cuadro clínico-patológico y el principio químico responsable de la misma.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS TÓXICAS EN URUGUAY

Las intoxicaciones por plantas tóxicas son un problema importante en bovinos y ovinos en condiciones de pastoreo en todo el mundo. Constituyen una permanente preocupación entre los profesionales implicados en el tema (Rivero y col., 2000; Riet-Correa y Medeiros, 2001).

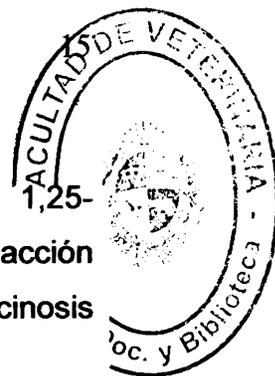
Planta tóxica de interés pecuario, es aquella que ingerida en condiciones naturales por los animales domésticos, causa daños a la salud, incluso la muerte, debiéndose comprobar experimentalmente su toxicidad (Tokarnia y col, 2000).

Además del riesgo para la salud humana, las plantas tóxicas ocasionan importantes pérdidas económicas, directas e indirectas. Las pérdidas directas son las ocasionadas por muertes de animales, disminución de la producción, problemas reproductivos y ocurrencia de otras enfermedades por inmunosupresión. Las pérdidas indirectas se deben a gastos de diagnóstico, tratamiento de animales enfermos, manejo, control de las plantas y depreciación de las tierras (Riet-Correa y Medeiros, 2000).

Es de difícil estimación el impacto económico de las intoxicaciones por plantas en el sector agropecuario. Se puede considerar en base a las pérdidas ocasionadas por muertes de animales. En Uruguay, con una población de más de 11 millones de cabezas de bovinos y similar cantidad de ovinos (DIEA, 2006), los laboratorios de diagnóstico estiman que 80.500 animales mueren anualmente por intoxicaciones por plantas, lo que corresponde a un 14% del total de muertes declaradas (Riet-Correa y Medeiros, 2001; Rivero y Riet-Correa, 2005).

En nuestro país, hasta el momento son conocidas 31 especies tóxicas, pertenecientes a 26 géneros, siendo el meteorismo por *Trifolium repens* y *T. pratense*, la causa más importante de muerte en bovinos adultos (Rivero y col., 2000; Riet-Correa y Medeiros, 2001).

Otras plantas importantes son las hepatotóxicas como *Senecio* spp, *Cestrum parqui*, plantas nefrotóxicas, neurotóxicas y calcinogénicas (Rivero y col., 2000).



3.2 PLANTAS CALCINOGENICAS

Las plantas denominadas calcinogénicas, contienen glucósido 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol o Vitamina D) o una sustancia con acción calcinogénica similar, por eso desencadenan un cuadro denominado calcinosis enzoótica (Wasserman, 1975; Mello y Habermehl, 1998).

Varias plantas con principios calcinogénicos han sido estudiadas hasta el momento: *Solanum glaucophyllum (malacoxylon)* (Carrillo y Worker, 1967; Camberos y Davis, 1969; Riet-Correa y col., 1975; Gimeno, 1977; Rivero y col., 1989), *Nierembergia veitchii* (Barros y col., 1970; Riet-Correa y col., 1987; Riet-Correa y col., 1993b; Rissi y col., 2007), *Cestrum diurnum* (Krook y col., 1975a; Krook y col., 1975b), *Trisetum flavescens* (Braun y col., 2000; Dirksen y col., 2003), *Solanum torvum* (Morris y col., 1979), *Stenotaphrum secundatum* (Arnold y Fincham 1997), *Solanum esuriale* (O'Sullivan, 1976) y *Solanum verbascifolium* (Tustin y col., 1973, citado por Mello, 2003).

En nuestro país se han descrito brotes por *Solanum glaucophyllum* en bovinos (Riet-Correa y col., 1987; Rivero y col., 1989), en ovinos (García y Santos y col., 2007) y un brote diagnosticado en caprinos (Soto C., comunicación personal, 2005).

Existe una comunicación de un brote en ovinos asociado a *Nierembergia repens*, no habiéndose comprobado experimentalmente la intoxicación (Mederos y col., 1991) y otro brote en la misma especie, de etiología desconocida hasta el momento, ocurrido entre octubre de 2005 y marzo de 2006 (García y Santos y col., 2006).

3.3 METABOLISMO DEL CALCIO Y FOSFORO

Los iones calcio y fósforo, desempeñan un papel primordial en procesos fisiológicos. Las concentraciones de estos iones están reguladas por los mismos sistemas (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

El calcio es importante para muchas reacciones intracelulares, incluidas la contracción muscular, la actividad de las células nerviosas, la liberación de las hormonas mediante exocitosis, así como la coagulación de la sangre, mantenimiento de la estabilidad de la membrana, adhesión entre las células e integridad de huesos y dientes (Greissinger, 2004; Guyton, 2007).

El fosfato inorgánico de la sangre sirve como fuente importante de fósforo para huesos y dientes. También funciona como sistema tampón en la sangre. El fosfato orgánico es un componente importante de la célula, encontrándose en la membrana plasmática y compuestos intracelulares (ácidos nucleicos, ATP, AMP) (Guyton, 2007).

Los depósitos de calcio se encuentran distribuidos de tres maneras, la mayor parte del calcio corporal (99%) se encuentra en el hueso, como cristales de hidroxiapatita (compuestos por calcio, fosfato y agua), otro depósito es el intracelular, importante para la realización de actividades fisiológicas, mientras que el depósito más pequeño e importante se encuentra en el líquido extracelular, vital para el control fisiológico de las concentraciones de calcio en sangre. La concentración promedio en plasma de este mineral varía normalmente entre 9 y 10 mg/dL (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

En plasma el calcio se encuentra distribuido de tres formas, aproximadamente un 40% circula unido a proteínas plasmáticas que no difunden a través de la membrana capilar, un 10 % que sí difunde a través de la membrana capilar pero se encuentra asociado a citratos o fosfatos y el 50% restante, difunde a través de la membrana capilar y se encuentra ionizado. Este calcio iónico es la forma que resulta más importante para la mayor parte de las actividades del organismo (Guyton, 2007).

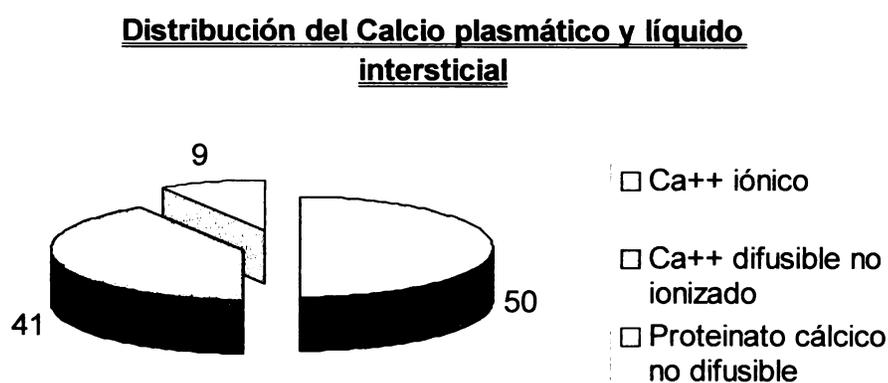


Figura 1: Distribución del calcio iónico (Ca⁺⁺) del calcio difusible pero no ionizado (Ca_x), y del proteinato cálcico no difusible (Ca prot) en el plasma sanguíneo. (Guyton, 2007)

El fosfato inorgánico se encuentra en el plasma de dos formas principalmente, fosfato ácido (HPO_4^-) y fosfato diácido (H_2PO_4^-). Cuando se eleva la cantidad total de fosfato en el líquido extracelular, lo hace la cantidad de cada uno de estos iones fosfato. Debido a que químicamente las cantidades exactas de HPO_4^- y H_2PO_4^- son difíciles de determinar, la cantidad total de fosfato se expresa en términos de miligramos de fósforo por decilitro de sangre, siendo la cantidad media de aproximadamente 4 a 5 mg/dL (Greco, 2005; Guyton, 2007).

Mientras que las variaciones del nivel de fosfatos en el líquido extracelular, entre un nivel muy inferior al normal y dos o tres veces superior al mismo, no tienen efectos corporales significativos inmediatos, las elevaciones o descensos del calcio iónico con frecuencia provocan efectos fisiológicos inmediatos. La relación relativa entre calcio y fósforo puede variar notablemente según las diferentes condiciones nutricionales, siendo la relación potencial Ca/P de 1,3 a 2,0 (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

Las concentraciones de iones calcio y fosfato en el líquido extracelular son considerablemente mayores que las necesarias para causar la precipitación de la hidroxiapatita (CaHPO_4). Sin embargo, en casi todos los tejidos del organismo, así como en el plasma, existen inhibidores que evitan esta precipitación, uno de ellos es el pirofosfato. Por lo cual, en los tejidos normales, excepto en el hueso, no se produce precipitación de cristales de hidroxiapatita, a pesar del estado de sobresaturación de los iones (Greco, 2005; Guyton, 2007).

Las sales de calcio que primeramente se depositan, no son cristales de hidroxiapatita, sino compuestos amorfos, para luego, mediante un proceso de sustitución y adición de átomos o reabsorción y nueva precipitación, transformarse en los cristales anteriormente mencionados. Sin embargo, un pequeño porcentaje puede permanecer en forma amorfa, lo cual es importante ya que estas sales amorfas, pueden reabsorberse rápidamente cuando existe una necesidad adicional de calcio en el líquido extracelular (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

Aunque las sales de calcio casi nunca precipitan en tejidos normales diferentes del hueso, sí lo hacen en condiciones anormales. Presumiblemente en estos casos, los factores que normalmente evitan el depósito de sales de calcio desaparecen de los tejidos, permitiendo así la precipitación (Greco, 2005; Guyton, 2007).

Mediante la inyección de calcio por vía endovenosa, se puede elevar la concentración de dicho ión de forma marcada, sin embargo, luego de transcurridos 30 minutos a 1 hora, dicha concentración se normaliza. De la misma manera, si se eliminan de los líquidos corporales grandes cantidades de calcio, su concentración se normalizará dentro del mismo plazo de tiempo. Existe en el hueso un tipo de calcio en forma de sal que es fácilmente movilizable como CaHPO_4 y otras sales amorfas (Greco, 2005; Guyton, 2007).

La gran importancia del calcio intercambiable, radica en el hecho de que brinda un sistema de amortiguación rápido para evitar que las concentraciones de calcio iónico de los líquidos extracelulares se eleven o desciendan en situaciones transitorias de exceso o falta de disponibilidad del mismo (Greco, 2005; Guyton, 2007).

3.4. FISIOLÓGIA Y FISIOPATOLOGIA DE LA VITAMINA D

La vitamina D es sintetizada en su totalidad en la piel, a partir de su precursor inmediato el 7 – deshidrocolesterol sintetizado a partir del acetato por las células epiteliales. Mediante la irradiación de luz UV, este precursor es transformado en vitamina D inactivada. Dentro del metabolismo de la misma, hay dos órganos que juegan un rol muy importante, los riñones y el hígado. Una vez formada la vitamina D en la piel, primero hace un pasaje por el hígado, donde es hidroxilada en la posición C – 25, para posteriormente sufrir su segunda hidroxilación en el riñón en la posición C – 1, dando como resultado el compuesto activo 1,25 – $(\text{OH})_2$ – vitamina D (Mello, 2003; Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

El control de la hidroxilasa C – 1 renal mediante la paratohormona (PTH), es el punto de control más importante dentro de la síntesis de la 1,25 –

vitamina D. Los descensos en las concentraciones del calcio estimulan la secreción de PTH, lo que a su vez promueve la síntesis de vitamina D activa y un aumento de la absorción intestinal de calcio. El fosfato también regula el metabolismo de esta vitamina (Mello, 2003; Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

Los efectos más importantes del $1,25 - (\text{OH})_2 - \text{vitamina D}$ (vitamina D activada), consisten en un aumento de la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal y estimulación de la síntesis de proteínas ligadoras de calcio en las células de la mucosa, que constituyen el paso limitante en la absorción del mismo (Mello, 2003; Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

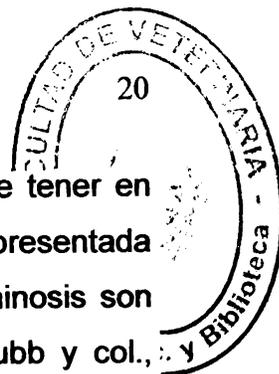
Ésta vitamina también estimula transporte pasivo del mismo. Además, tiene efectos sobre el hueso, induciendo el movimiento de los iones calcio desde el depósito lábil hacia los líquidos extracelulares y la resorción ósea, como también potencia los efectos de la PTH en el metabolismo óseo del calcio (Mello, 2003; Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

En el control normal del metabolismo del calcio, la PTH es la principal responsable en el mantenimiento de la homeostasis del mismo, mediante dos mecanismos principales. En primer lugar provoca la reabsorción calcio y fosfato del hueso y secundariamente aunque de forma más rápida, disminuye la excreción y aumenta la absorción de calcio por los riñones, también aumenta la excreción de fósforo (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

Otra hormona involucrada en el metabolismo del calcio es la calcitonina. Ésta disminuye rápidamente las concentraciones de calcio iónico plasmático de dos maneras. Primero, el efecto inmediato consiste en disminuir la actividad reabsortiva en el tejido óseo y favorecer el depósito de sales de Ca^{++} intercambiable. Segundo, actúa disminuyendo la neoformación de osteoclastos (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

Aproximadamente, con un 10% de aumento de las concentraciones de Ca^{++} plasmático, se produce un aumento en la tasa de secreción de la calcitonina. Mediante este mecanismo, se logra un rápido restablecimiento de las concentraciones plasmáticas de dicho ión (Greissinger, 2004; Greco, 2005; Guyton, 2007).

En determinadas ocasiones cuando se suministra vitamina D como suplemento en exceso a los animales ocurren casos de hipervitaminosis. La



misma se caracteriza por hipercalcemia e hiperfosfatemia. Se debe tener en cuenta que éstos niveles no guardan relación con la sintomatología presentada por lo animales. También las lesiones producidas por la hipervitaminosis son indiferenciables con las producidas por plantas calcinogénicas (Jubb y col., 1990).

3.5 CALCINOSIS ENZOÓTICA

3.5.1 Concepto

La calcinosis enzoótica es una intoxicación crónica, causada por la ingestión de plantas calcinogénicas que afecta rumiantes y equinos. Los principios calcinogénicos ocasionan depósitos de sales de calcio en tejidos blandos, lo que produce un grave deterioro físico y depreciación de las reses, causando importantes pérdidas económicas (Gimeno, 2000).

Es una enfermedad bien conocida en el país, ha sido denominada como "enteque seco", mientras que en la región ha recibido distintas denominaciones: "bichoquera", "guata-í" (del guaraní: caminar corto), "espichamiento", "espichaço", más corrientemente (Gimeno 2000).

3.5.2 Etiopatogenia

Esta enfermedad se presenta tras la ingestión repetida de plantas con poder calcinogénico (Gimeno 2000). Las plantas han sido identificadas en muchas partes del mundo y la toxicidad esta relacionada con un glucósido 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol o Vitamina D) o una sustancia con acción similar, por eso desencadenan un cuadro denominado calcinosis enzoótica (Wasserman, 1975; Mello y Habermehl, 1998).

En el animal existe un desbalance del metabolismo del calcio y fósforo resultando en calcificaciones en aorta, riñón, corazón, pulmón y otros tejidos, siendo estas las responsables del cuadro clínico (Carrillo y Worker, 1967; Dobereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Eckell y col., 1960).

En un trabajo sobre entequ seco Riet-Correa y col. (1975), nombran dos aspectos fundamentales para que se produzca la enfermedad: uno es la presencia de la planta y el otro es un adecuado aporte de calcio y fósforo en la dieta. Esto explicaría la mayor incidencia en animales adultos que en categorías jóvenes.

3.5.3 Epidemiología

La calcinosis fue descrita por primera vez en Argentina en 1898 por Lignieres quien en sus trabajos mencionó que dicha enfermedad era conocida de mucho antes (citado por Gimeno, 2000). Posteriormente otros autores se dedicaron al estudio del tema realizando reproducciones experimentales en diversas especies y probando distintas plantas (Riet-Correa y col., 1975).

La intoxicación ha sido descrita en Uruguay (Riet-Correa y col., 1975; Rivero y col, 1989; Mederos y col, 1991; García y Santos y col, 2006; García y Santos y col, 2007), en Argentina (Carrillo y Worker, 1967; Camberos y Davis, 1969; Gimeno, 1977), en Brasil (Barros y col, 1970; Dobereiner y col., 1971; Tokarnia y Dobereiner, 1974; Riet-Correa y col., 1987; Riet-Correa y col., 1993a) y en otros países del mundo (Tustin y col., 1973; Krook y col., 1975a; Krook y col., 1975b; Gill y col., 1976; Gurkipal y col., 1976; Dirksen y col., 2003).

Brotos de calcinosis enzoótica en ovinos y caprinos, de etiología desconocida han ocurrido en Sudáfrica, India, Israel (Tustin y col., 1973; Gill y col., 1976; Newman y col., 1970, citado por Mello, 2003) y Argentina (Gimeno, comunicación personal, 2008).

Las plantas calcinogénicas presentes en la región crecen fundamentalmente en zonas bajas de campo natural. Es importante también la época del año en relación a los ciclos de crecimiento de las mismas. Muchas veces, los años de sequía son los más proclives a la presentación de esta enfermedad. Se calcula en predios de campo natural con infestación baja, 0.5 plantas/ m² y altas 5 plantas/ m² (Zanoniani y Ducamp, 2002).

La morbilidad puede llegar hasta 80%, la letalidad generalmente es baja, pudiendo llegar en algunos potreros hasta un 60% (Riet-Correa y col., 1987). No existe predisposición por sexo, sí es importante la categoría y el tiempo de permanencia en esos potreros invadidos por las malezas tóxicas (Riet-Correa y col., 1987; Gimeno, 2000).

3.5.4 Importancia económica

Estudios que datan de tiempo, calcularon la incidencia de esta intoxicación en países de la región. En Argentina, fueron estimadas en 300.000 las cabezas de ganado muertas anualmente por esta causa (Carrillo y Worker, 1967).

Barros y col. (1970), comunicaron que en Brasil, 2178 cabezas de ganado sometidas a sacrificio, presentaron importantes lesiones de calcinosis y Riet-Correa y col. (1987) estimaron que 8 de cada 350 ovinos presentaron lesiones de calcificación.

Sin embargo, las mayores pérdidas son de carácter productivo y en animales que generalmente no manifiestan los signos clínicos de la intoxicación como ocurre en ovinos, las mayores pérdidas se traducen en una disminución de la producción de carne y lana (Riet-Correa y col., 1987).

3.5.5 Signos clínicos

Por ser una enfermedad de curso crónico, los síntomas aparecen generalmente en animales mayores de tres años. Los animales comienzan con deambulación, renuentes a ejecutar movimientos, existiendo en ellos rigidez de bípedos anteriores (Eckell y col. 1960; Dobereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Gimeno, 2000).

La intoxicación produce marcada pérdida de peso en animales clínicamente afectados y disminución en la conversión alimenticia en aquellos que no presentan signos clínicos evidentes (Eckell y col. 1960; Dobereiner y col., 1971; Riet - Correa y col., 1975; Gimeno, 2000).

Los animales enfermos presentan disnea y taquicardia que se agravan con el ejercicio y en épocas calurosas. Solo se manifiestan síntomas alarmantes cuando las lesiones son muy intensas, pudiendo morir súbitamente al ser movilizados (Eckell y col. 1960; Camberos y Davis, 1969; Dobereiner y col., 1971; Riet - Correa y col., 1975; Gimeno, 1977; Gimeno, 2000). Además de la cantidad de planta ingerida para la presentación de los síntomas, debemos recordar que siempre juega un rol fundamental la susceptibilidad individual (Riet-Correa y col., 1987; Gimeno, 2000).

3.5.6 Patología

Las lesiones macroscópicas se localizan fundamentalmente en el sistema cardiocirculatorio y muscular. Las arterias se presentan endurecidas, engrosadas y rígidas, observándose en la íntima elevaciones irregulares y placas blanquecinas de tamaño irregular y superficie rugosa, pudiéndose observar la misma uniformemente endurecida (Eckell y col. 1960; Carrillo y Worker, 1967; Dobereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Riet-Correa y col., 1987; Schild, 1993; Gimeno, 2000).

Además de la aorta y otras arterias, se pueden encontrar áreas de mineralización de grado variable en válvulas cardíacas y superficie endocárdica. En pulmón, se presentan áreas inelásticas, especialmente en lóbulo diafragmático, de apariencia pétreo. En la corteza renal se observan áreas blanquecinas de mineralización, así como también estrías homogéneas blanquecinas en la médula (Eckell y col., 1960; Carrillo y Worker, 1967; Dobereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Gill y col., 1976; Schild, 1993; Barros y Gimeno, 2000; Mello, 2003).

Varios tendones y ligamentos pueden aparecer calcificados, así como también en el diafragma se observan placas opacas y rugosas de calcificación. Las glándulas tiroides presentan puntos blanquecinos de tamaño variado, como también se pueden observar lesiones en distintos cartílagos articulares (Eckell y col., 1960; Krook y col, 1975a; Gill y col, 1976; Riet Correa y col, 1993^a; Moraña y col., 1994; Barros y Gimeno, 2000; Tokarnia y col, 2000; Gimeno, 2000; Mello, 2003; Barros y col, 2006).

Las paredes uterinas, en la intoxicación por *N. veitchii*, se pueden encontrar engrosadas, duras e inelásticas como resultado de una severa mineralización (Riet-Correa y col, 1987; Schild, 1993).

Como hallazgos histopatológicos se observan degeneración y mineralización de las fibras elásticas de la capa íntima y media de aorta y otras arterias, estando también involucradas las fibras de colágeno y la sustancia cementante. Dichas lesiones son también halladas en forma severa en órganos como útero, músculo esquelético, rumen, intestinos, glándula tiroides, linfonódulos y bazo (Eckell y col., 1960; Riet-Correa y col, 1975; Riet-Correa y col, 1993b; Barros y Gimeno, 2000; Gimeno, 2000; Barros y col, 2006).

Además se pueden observar áreas de mineralización von Kossa positivas, en la capa media de las arterias, con fragmentación de las fibras elásticas, presencia de infiltrados de macrófagos y de células gigantes multinucleadas (Barros y col., 1970; Döbereiner y col., 1971; Tokarnia y Döbereiner, 1974; Riet-Correa y col., 1987; Rivero y col., 1989; Vasconcelos y col., 1998; Gimeno, 2002; Barros y col., 2006).

Las fibras del miocardio también pueden mostrar degeneración, necrosis y calcificación, siendo posteriormente sustituidas por tejido fibroso. Se pueden encontrar lesiones de calcificación distrófica en pulmones, así como también los cartílagos de tráquea y bronquios. Las arterias renales también pueden mostrar áreas de calcificación, así como también el intersticio renal (Eckell y col., 1960; Krook y col, 1975a; Gill y col., 1976; Riet Correa y col., 1993a; Moraña y col., 1994; Barros y Gimeno, 2000; Tokarnia y col., 2000; Gimeno, 2000; Mello, 2003; Barros y col., 2006).

Algunas células C de la tiroides se pueden encontrar hipertrofiadas (Neumann y col., 1977; Schild, 1993).

A la microscopía electrónica, el estudio de la pared de la aorta puede revelar unas células musculares con pérdida de sus características diferenciales, en especial en lo relacionado a sus fibrillas intracitoplasmáticas y densidad. Las fibras elásticas muestran una banda periférica electro-densa y muchas veces depósitos cristalinos (Barros y col., 1981; Gimeno, 2000; Mello, 2003).

Experimentalmente en conejos intoxicados con *S. glaucophyllum*, fueron observadas proliferaciones de macrófagos y células gigantes en tráquea y bronquios (Barros y col., 2006); las mismas fueron identificadas en estómago, así como alteraciones ultraestructurales de células musculares lisas del estómago (Moraña y col., 1994).

3.5.7 Diagnóstico

El diagnóstico se basa principalmente en una correcta anamnesis, presencia de signos clínicos y datos anatomopatológicos (Riet-Correa y col., 1993).

Opcionalmente, para aproximarse a un diagnóstico definitivo, se pueden realizar estudios colaterales como radiografía (Braun y col., 2000). La ultrasonografía permite evaluar la presencia de calcificaciones, presentando una especificidad del 100 por ciento en los riñones, siendo menores en aorta abdominal y válvulas cardíacas (Franz y col., 2007).

En Uruguay, un brote de calcinosis enzoótica por *S. glaucophyllum* en cabras, fue confirmado mediante el uso de la ultrasonografía (Soto, comunicación personal, 2005).

En el análisis de sangre se pueden evidenciar hipercalcemia o hiperfosfatemia (Jubb y col., 1990; Gimeno, 2000). Debemos tener en cuenta que estos valores pueden verse alterados debido al ejercicio y estado emocional, ya que los animales no están habituados al contacto físico con los humanos (Kramer, 2000).

El estudio microhistológico de la materia fecal para constatar la presencia de fragmentos de epidermis vegetales (Dusi, 1949; Holechek y col., 1982), estaría confirmando el consumo de planta problema (Panter y col., 1987; Yagueduú y col., 1998; Yagueduú y col., 2000; García y Santos y col., 2004).

Para el diagnóstico diferencial, se deben tener en cuenta otras afecciones consuntivas de curso crónico como la paratuberculosis y gastroenteritis parasitarias. También algunas enfermedades carenciales como en el caso de cobre o fósforo (Gimeno, 2000).

Es importante señalar que si la sintomatología, lesiones y resultados del laboratorio son coincidentes con los de una calcinosis, se debería considerar la posibilidad de sobredosificaciones con vitamina D. No puede descartarse finalmente, la existencia de otros vegetales con efectos calcinogénicos aún no demostrados (Gimeno, 2000; Mello, 2003).

3.5.8 Control y profilaxis

La búsqueda de tratamientos específicos para el control del entequo seco es llevada a cabo desde hace muchos años, en diferentes partes del mundo, no encontrándose aún ninguna sustancia capaz de evitar los procesos de calcificación en los animales (Gimeno, 2000).

Los potreros invadidos por malezas calcinogénicas pierden su condición al implantar en ellos pasturas perennes, como también haciendo rotación con cultivos de arroz (Prof. Severo Sales de Barros, comunicación personal, 2002).

Aquellos animales que pastorean potreros problemáticos pueden ser llevados a otros potreros en donde no existan otras malezas tóxicas, ya que de esta manera las lesiones no avanzan y los animales pueden engordar (Eckell y col. 1960; Gimeno 2000).

3.6 INTOXICACIÓN POR *Nierembergia veitchii* EN OVINOS

3.6.1 Descripción botánica del género

Es un género exclusivamente americano, con 20 especies en América del Sur y una en México, siendo Argentina el centro de la diversificación con 15 especies (Hunziker, 2001 citado por Vignoli-Silva 2006)

Son plantas de la familia de las solanáceas, de ciclo anual, crecen de forma rastrera mezclada con la vegetación nativa (Schild, 1993). Los tallos pueden ser radicales o no radicales, erectos u ondulados. Presentan hojas alternas y enteras, lineares o linear - lanceoladas. Las flores son hermafroditas, grandes o pequeñas, solitarias o cimosas, de color blanco, azul o liliáceas. Su cáliz es cilíndrico o acampanado, ligeramente pentadactado o pentasecto. El fruto es una cápsula bilocular dehisciente por dos valvas, siendo las semillas numerosas y angulosas (Burkart, 1979).

Dentro de género, la especie de interés pecuario en ovinos es la *N. veitchii*, la cual ha sido estudiada en Rio Grande del Sur (Brasil) desde hace ya varios años (Barros y col, 1992; Schild, 1993; Riet-correa, 1993b; Rissi, 2007). La misma crece rastrera, mezclada con la vegetación nativa, con una raíz principal, los tallos son ascendentes algo leñosos con hojas elípticas hasta dos tercios del largo del tallo. Presenta el limbo de la corola campanulado, polen en tétradas y estigma capitulado o lentiforme (Vignoli-Silva, 2006). Florece de octubre a febrero, sus flores son blancas. Si bien es palatable y consumida por los animales (Schild, 1993), es una planta dañina e invasora de las pasturas naturales (Vignoli-Silva, 2006).

La especie mencionada anteriormente no ha sido descrita en nuestro país, si existen otras especies del mismo género como ser: *N. rivularis* y *N. calycina* (Alonso E, 2007. Comunicación personal).

La *N. rivularis* posee tallos radicales, rastreros y delgados, con hojas obovadas o espatuladas. Sus flores son casi sésiles con cáliz tubuloso y corola blanca o liliácea (Burkart, 1979). En el país, esta especie se encuentra principalmente en los departamentos de Colonia (Riachuelo, Costas del Río de la Plata), Soriano (Mercedes, Isla Pichón), Tacuarembó (Paso de los Toros, Bequeló), Río Negro (cercañas de Paso del Puerto), Rivera (Bañado Grande), Rocha (Lascano) (Alonso E, 2008. Comunicación personal).

La otra especie presente en el país *Nierembergia calycina*, posee tallos rastreros, no radiculados, hirsutos y laxamente hojosos. Su hoja es peciolada y lamina obovada, obtusa y cortamente apiculada, entera, mas o menos densamente hirsuta. Flores blancas o liliaceas, opuestas a las hojas de los extremos de los tallos. Presenta pedúnculo corto, cáliz acampanado, dividido en su tercio superior en 5 lóbulos ovados, agudos, anchos y trinervados, con largos pelos blancos sobre las nervaduras (Burkart, 1979).

3.6.2 Factores epidemiológicos

3.6.2.1 Dependientes del Animal

El hábito de consumo de los ovinos a diferencia de los bovinos, siendo los primeros más selectivos y comiendo a ras del suelo (Montossi y col., 2000), lleva a que las intoxicaciones por este género sean mayormente descritas en dicha especie (Schild, 1993).

En los casos clínicos descritos no se ha comprobado una relación fehaciente entre razas ni tampoco género o categoría, siendo los corderos lactantes, la única categoría en no presentar la patología (Schild, 1993).

3.6.2.2 Dependientes de la Planta

Al tratarse de plantas que florecen de octubre a febrero, su floración puede variar acorde al clima, floreciendo más temprano a fines de agosto o setiembre y desapareciendo a fines de diciembre o enero. Se trata de una planta muy palatable, siendo consumida normalmente por los animales (Schild, 1993; García y Santos y col., 2006).

Datos publicados en Brasil le otorgan a dicho género una morbilidad de hasta 80% y una letalidad generalmente baja, aunque en algunos potreros puede llegar cerca del 60% (Riet-Correa, 1987).

3.6.2.3 Relacionados al Medio Ambiente

Se han descrito variaciones en la existencia de *N. veitchii* entre años, establecimientos y potreros de un mismo predio. Posiblemente la duración de su ciclo vegetativo también se vea afectada (Schild, 1993).

En los años que ocurren sequías prolongadas en la primavera y verano, la morbilidad asciende a tasas elevadas, coincidiendo con la presencia de grandes cantidades de planta en los campos, como también por un aumento en su distribución. La sequía es un factor clave en el aumento de la incidencia de la enfermedad, debido a un aumento de la disponibilidad de la planta asociado a la escasez de forraje ocurrida en estos períodos (Méndez y col., 1990; Schild, 1993; García y Santos y col., 2006).

3.6.3 Signos clínicos

La intoxicación se caracteriza por enmagrecimiento progresivo con retracción de la pared abdominal y marcha envarada, principalmente de miembros anteriores. La rigidez de miembros anteriores se hace más evidente cuando los animales se levantan. Como signos complementarios puede observarse xifosis y respiración disneica (Schild, 1993; Riet-correa, 1993b; Rissi, 2007).

Los animales afectados pueden morir súbitamente cuando son sometidos a esfuerzo físico como arreos para baños o dosificaciones. Los animales que no muestren signos clínicos pueden presentar pérdidas de peso o disminución del rendimiento.

3.6.4 Patología

En la necropsia se evidenció un endurecimiento y engrosamiento con pérdida de la elasticidad de las arterias, con excepción de las pulmonares (Barros, 1992; Schild, 1993; Riet – Correa, 1993b; García y Santos y col., 2006; Rissi, 2007).

La aorta, presenta una capa íntima de aspecto rugoso, cubierto por placas mineralizadas blanquecinas de forma y tamaño irregular (Barros, 1992; Schild, 1993; Riet-Correa, 1993b; García y Santos y col., 2006; Rissi, 2007).

Las válvulas cardíacas, mitral y sigmoidea aórtica, presentan engrosamiento, forma irregular, encontrándose endurecidas y crepitan al corte, así como también las cuerdas tendinosas. Los riñones presentan discretas estrías de forma focal en la corteza y líneas blanquecinas en la médula. En pulmones se observan áreas de mineralización en los bordes de los lóbulos diafragmáticos (Barros, 1992; Schild, 1993; Riet – Correa, 1993b; Rissi, 2007). El útero puede presentar áreas de calcificación y pérdida de la elasticidad (Schild, 1993).



También se observaron estrías blanquecinas en capa muscular de rumen y omaso. El hígado se puede apreciar con aspecto de nuez moscada. Los cartílagos articulares se encuentran con erosiones de color blanco, principalmente en articulación coxofemoral y carpometacarpiana. Otros hallazgos complementarios son ascitis e hidrotórax y presencia de nódulos blancos en la superficie de corte de la tiroides (Barros SS, 1992; Schild, 1993; García y Santos y col., 2006; Rissi, 2007).

A la histopatología, las arterias afectadas se encuentran engrosadas, edematizadas, eosinofílicas y fragmentadas en la capa media e íntima. Son fácilmente evidenciables los depósitos de sales de calcio en las fibras elásticas degeneradas, así como también la calcificación severa de las fibras de colágeno y sustancia cementante. Estas lesiones anteriormente descritas han sido también halladas en válvulas cardíacas y cuerdas tendinosas (Barros SS, 1992; Schild, 1993; García y Santos y col., 2006; Rissi, 2007).

En los pulmones hay degeneración y calcificación de los cartílagos bronquiales, septum interlobulares y músculo peribronquial, así como también en cartílagos traqueales (Barros SS, 1992; Schild, 1993; Riet Correa y col, 1993b; Rissi, 2007).

Los riñones presentan degeneración y ruptura de la membrana basal del epitelio de los túbulos, calcificación del tejido intersticial y depósitos de sales de calcio en las células de los túbulos. Otro hallazgo importante es la fibrosis de la cápsula de Bowman (Barros SS, 1992; Schild, 1993; Riet Correa y col, 1993b; Rissi, 2007).

La tiroides presenta hiperplasia de las células C, que se presentan en camadas alrededor de los folículos y distribuidas entre ellas. Las células de la paratiroides se encuentran atrofiadas, con una relación citoplasma – núcleo disminuído (Barros SS, 1992; Schild, 1993; Riet Correa y col, 1993b; Rissi, 2007).

En el tejido óseo se observan líneas basofílicas con pérdida de la birrefringencia, las cuales fueron observadas en la superficie del osteoide y trabéculas óseas. Dichas líneas probablemente están relacionadas a una producción anormal de tejido óseo por los osteoblastos. Se observa una discreta osteopetrosis caracterizada por un engrosamiento de las trabéculas en la metáfisis y epífisis. También se presentan áreas de osteonecrosis identificadas por la presencia de osteocitos muertos con lagunas vacías en el centro de las trabéculas anteriormente citadas (Barros SS, 1992; Schild, 1993; Riet Correa y col, 1993b; Rissi, 2007).

Hay poca diferenciación del cartílago articular, con una zona de reposo mayor y pequeñas zonas columnares y vesiculares, así como una capa densa de hueso compacto en contacto con el cartílago (Riet Correa y col, 1993b; Schild AL, 1993; Rissi, 2007).

3.6.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la intoxicación es realizado por datos epidemiológicos, observación de los signos clínicos, bioquímica sanguínea y hallazgos de necropsia. Se debe tener en cuenta que la planta puede no estar presente en los potreros al momento de la muerte de los animales afectados (Schild, 1993).

El diagnóstico diferencial, debe incluir patologías que produzcan enmagrecimiento, principalmente parasitosis gastrointestinales y enfermedades mortales de curso agudo que producen muertes súbitas como enterotoxemia, edema maligno, hepatitis necrótica y haemoncosis aguda (Schild, 1993; Rissi, 2007).

3.6.6 Control

No existe tratamiento. Se debe evitar la ingestión de la planta por los ovinos. En épocas de ocurrencia de la planta, se puede utilizar un pastoreo rotativo con bovinos. Es importante que el productor reconozca en su establecimiento los potreros problema y evite colocar ovinos durante los meses de setiembre a febrero (Schild, 1993).

Si hay presencia de planta en todos los potreros del establecimiento, una alternativa puede ser la producción ovina estacional, entre los meses de febrero y octubre (Schild, 1993).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la intoxicación por *N. rivularis* (*N. repens*) en ovinos del norte del país.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar epidemiológicamente el brote natural de calcinosis en ovinos ocurrido en el departamento de Rivera
- Identificar botánicamente la planta tóxica causante del brote.
- Realizar el diseño experimental de la intoxicación calcinogénica en ovinos.
- Describir el cuadro clínico, la patología macroscópica y microscópica de la intoxicación experimental por la planta calcinogénica.
- Determinar el principio activo de la planta causante de la intoxicación.
- Realizar estudios microhistológicos de la epidermis de la planta y de la materia fecal de los ovinos sometidos al estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

Se visitó el predio problema del productor Sr. José Mario Da Cunha hijo, ubicado en el departamento de Rivera, 6ª seccional policial, paraje Bañado Grande, ruta 44, 30 km al NE del Pueblo Ansina, coordenadas S 31°47'12,7", W 55°10'26,4". Esta visita se realizó en conjunto con docentes de Toxicología, los veterinarios actuantes Dres. Mónica Rodríguez y Alvaro Seoane y del Botánico Eduardo Alonso de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química de la Universidad de la República.

Para obtener mayor información acerca de la epidemiología regional se concurrió a los establecimientos de la zona y se realizó un cuestionario a los productores acerca de posibles brotes sospechosos no diagnosticados en años anteriores (*Ver Anexo*).

También se indagó a los veterinarios que trabajan en la zona acerca de posibles casos de entequo seco ocurridos en años anteriores.

5.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Junto con el Botánico E. Alonso se recorrió el predio para recolectar manualmente malezas sospechosas.

Se extrajeron muestras de la planta y tapiz del predio para ser llevadas a la cátedra de Botánica (Facultad de Química) para su clasificación. Además se identificaron especies presentes en el tapiz del potrero problema y del potrero control mediante la observación visual, clave botánica y comparación con ejemplares de herbario.

En su recorrida por el establecimiento el botánico identificó las zonas de mayor densidad de planta con la finalidad de realizar posteriormente pastoreo controlado con los ovinos.

5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el experimento, usando cerco eléctrico se delimitó un área de 625m² (correspondiente a 1/16 de Há.) en la zona del potrero anteriormente indicada por el botánico, donde se colocaron los ovinos. El cerco se rotó de forma estratégica, cada 15 días, durante un período total de tres meses.

Se utilizaron cuatro ovinos cruza Corriedale, uno fue control y los otros tres restantes pastorearon las áreas identificadas. Los animales fueron comprados con un peso promedio de 20kg, provenientes de un predio libre de plantas potencialmente tóxicas.

Previo al inicio del experimento los ovinos fueron identificados y examinados clínicamente. Se realizaron estudios coproparasitarios (Técnica de McMaster y Happich & Boray) a intervalos de 30 días, con el fin de monitorear el grado de infestación de los mismos. Además fueron inmunizados contra clostridiosis y desparasitados con doramectina (0.2mg/Kg. de peso vivo) y closantel (5mg/Kg.) previo al inicio del experimento.

Los 3 ovinos sometidos al pastoreo de las áreas seleccionadas tuvieron a disposición sombra y agua *ad libitum*. Cada 15 días, al concurrir al predio problema, se mudó el cerco eléctrico de tal manera que dichos animales pudieran acceder a buena disponibilidad de pastura y planta sospechosa. El ovino control pastoreó en un potrero libre de la maleza, con sombra y agua *ad libitum*, dentro del mismo establecimiento.

En los días que no se concurreó al predio, los ovinos fueron supervisados y controlados por personal capacitado del establecimiento, de tal manera que se cumplieran las condiciones anteriormente citadas.

A los 90 días de comenzado el experimento los ovinos fueron trasladados al Hospital de la Facultad de Veterinaria, para el posterior sacrificio.

5.4 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO CLÍNICO

En cada inspección, todos los animales fueron evaluados clínicamente, pesados y sangrados (por venopunción yugular usando vacutainer®) para evaluar fosfatemia y calcemia.

Los métodos usados fueron fotométrico colorimétrico para calcio (Calcium liquicolor) y análisis fotométrico UV para la determinación de fósforo (Phosphorus liquirapid), siendo ambos pertenecientes a la marca Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH®. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Veterinaria a cargo del Dr. Pedro Martino.

Una vez trasladados al Hospital de Facultad de Veterinaria, para complementar los datos clínicos, en los animales se realizaron estudios radiológicos y ultrasonográficos. Luego fueron sacrificados con tiopentona y exsanguinados.

Las necropsias se llevaron a cabo en la sala de necropsia de la Facultad de Veterinaria, de acuerdo a los protocolos del DILAVE (MGAP).

Las muestras tisulares de pulmón, tráquea, corazón, aorta, esófago, intestino, peritoneo, riñones, adrenales, hígado, bazo y sistema nervioso central, fueron fijadas en formalina bufferada al 10% y procesadas rutinariamente por el Dr. Rodolfo Rivero (Director Di.La.Ve. Paysandú), siendo posteriormente coloreadas con hematoxilina-eosina y por método de von Kossa, para evidenciar las áreas de mineralización.

5.5 ANÁLISIS MICROHISTOLÓGICO

Con la epidermis de la planta y materia fecal de los animales, se procedió a realizar la técnica microhistológica en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria.

Para la técnica se utilizaron hojas verdes de *N. rivularis*, de las que se obtuvieron fragmentos epidérmicos del haz y del envés, mediante raspado con hojas de bisturí y por el método de diafanizado. Las epidermis se colocaron en portaobjetos con glicerina al 50%, cubiertas y observadas al microscopio a 20x y 40x.

Muestras de materia fecal recolectadas durante el ensayo se trituraron en mortero, se digirieron en 3 ml de ácido nítrico a 65% y se llevaron a 60°C en baño de agua durante 1 minuto. Posteriormente se disolvieron en 200 ml de agua, pasando la mezcla por 2 tamices de 1 y 0,2 mm respectivamente. La fracción intermedia de las mismas se recogió para realizar 3 preparados histológicos. Se observaron microscópicamente a diferentes aumentos, para reconocimiento y caracterización de la especie de interés.

5.6 DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

Se recolectó planta problema, se secó a la sombra, posteriormente se procedió a la molienda, siendo almacenada y envasada adecuadamente hasta la preparación de los extractos.

Los extractos se realizaron con 90g de hoja y 500ml de solventes con polaridad en aumento: cloroformo, etanol y agua. Luego de 3 días de maceración a temperatura ambiente, se filtraron y posteriormente se evaporaron en rotavapor en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria (Oliveira, 1999).

Se retomaron los extractos con 1ml de solvente respectivo y fueron separados por cromatografía en capa fina (TLC), en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Química, guiados por el Prof. Dr. Horacio Heinzen y Lic. Alejandro Ruiz-Díaz.

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

En la visita junto al Botánico Eduardo Alonso, luego de una recorrida por el predio del Sr. Mario da Cunha hijo, procedimos a identificar el potrero problema. El mismo presenta ondulaciones leves, con costas a uno de los afluentes del Río Yaguari, donde se observaron inflorescencias de color blanco con centro amarillo, de 5 pétalos, característicos de las solanáceas.



Figura 2. Zona baja del potrero problema donde se comprobó la presencia de planta. Véase las floescencias de color blanco características.

En las partes bajas del potrero, fue donde se observó una mayor densidad de la planta potencialmente calcinogénica. El potrero presentó una oferta promedio de 1500 Kg. de materia seca (MS) por hectárea (Há.), mientras que la planta sospechosa se estimó en 50 Kg/MS por Há. promedio durante el tiempo de experimentación.

En las partes altas del potrero problema, así como en los potreros sin costa sobre el mencionado río o algunos de los afluentes, no se identificaron ejemplares de la especie en estudio.

En el establecimiento, luego de la entrevista con el productor y el veterinario encargado, se determinó que la especie afectada en este caso era la ovina. Dentro de ésta, las categorías que permanecían por más tiempo en el predio y que se encontraban pastoreando en el potrero anteriormente mencionado, no habiéndose encontrado predisposición de raza ni sexo.

Luego de la encuesta realizada a los productores y veterinarios de la zona, la mayoría de ellos manifestaron tener conocimiento de la presencia de la planta en las partes bajas con costas al Río Yaguari. La mayoría de los productores que poseían ovinos y campos en costas de este río, no le otorgaban a la planta gran importancia ni tampoco la asociaban a casos clínicos similares a los ocurridos en el predio problema.

Si bien el sistema de cría de la zona es mayoritariamente mixto (ganadería ovina y bovina), cabe destacar que muchos productores afirmaron que dichos potreros eran destinados principalmente a bovinos.

6.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La planta sospechosa, encontrada únicamente en el potrero problema, fue clasificada como *Nierembergia rivularis* (*repens*), número de herbario 4228 MVFQ E. Alonso Paz.



Figura 3. *Nierembergia rivularis*

Una planta perteneciente al mismo género, clasificada como *Nierembergia calycina* número de herbario 4323 MVFQ E. Alonso Paz, fue encontrada en la zona, pero no en el predio problema.

Otras plantas encontradas en las muestras de tapiz del potrero problema y control fueron: *Eryngium echinatum* Urban (APIACEAE), *Setaria geniculata* (Lam.) Beauv. (POACEAE), *Oxalis articulata* Sav. ssp. *Articulata* (OXALIDACEAE), *Cynodon dactylon* (GRAMINEAE), *Scutellaria racemosa* Persoon (LAMIACEAE), *Eleocharis* sp. (CYPERACEAE), *Panicum* sp. (POACEAE), *Soliva sessilis* Ruiz & Pav. (ASTERACEAE). Las mismas fueron clasificadas por el Lic. E. Alonso Paz

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

La zona del predio problema donde existía mayor dotación de planta fue la costa del campo, donde se procedió a desarrollar el experimento.

Con el uso del cerco eléctrico se logró la contención de los animales y restricción del pastoreo a un área y superficie específica, usando una carga animal de 0,6 UG/há. Con esto se logró disminuir la capacidad de selección de la pastura de modo que el cuadro fue consumido de forma uniforme, sin dejar un remanente importante.



Figura 4. Cerco eléctrico para control de pastoreo.

6.4 DATOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS

6.4.1. Datos clínicos

Durante el experimento los parámetros de frecuencia cardíaca, respiratoria, ruminal y temperatura corporal se mantuvieron dentro de los límites fisiológicos.

Los análisis coproparasitarios (técnica de McMaster), revelaron una baja infestación parasitaria ya que en ningún momento superaron los 800 hpg y en todos los muestreos el análisis de Happich y Boray resultó negativo.

Clínicamente la observación más importante fue que los animales no podían acompañar el arreo de la majada, quedando rezagados y fatigados. Si bien en ningún momento mostraron signos alarmantes, estos aumentaron cuando se los sometió a esfuerzo físico.

Las variaciones de peso de los animales se observan en la siguiente gráfica:

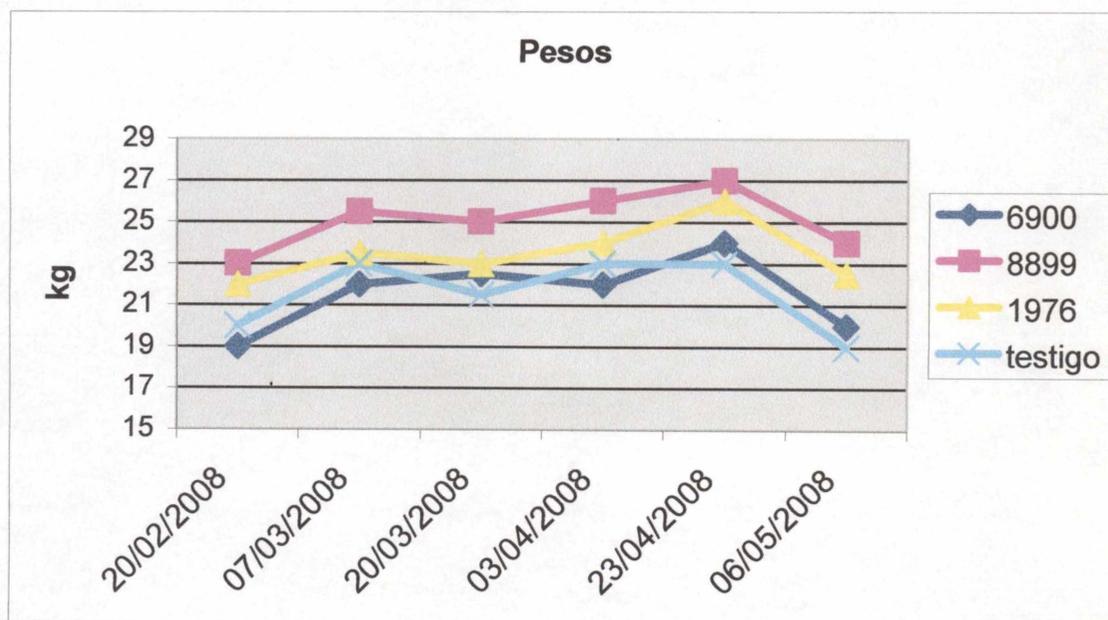


Figura 5. Evolución del peso vivo de los animales durante el período de experimentación.

Los niveles de calcemia y fosfatemia, así como la relación calcio-fósforo se muestran en las siguientes gráficas:

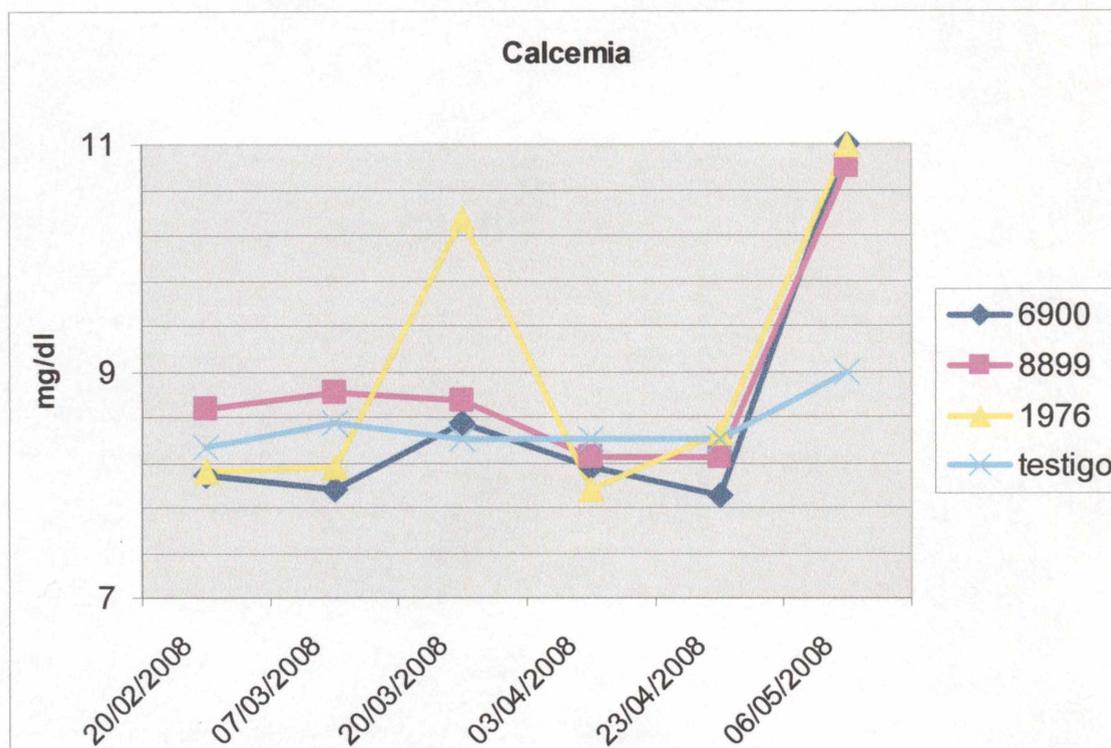


Figura 6. Evolución de los niveles de calcio sérico de los animales durante el período de experimentación.

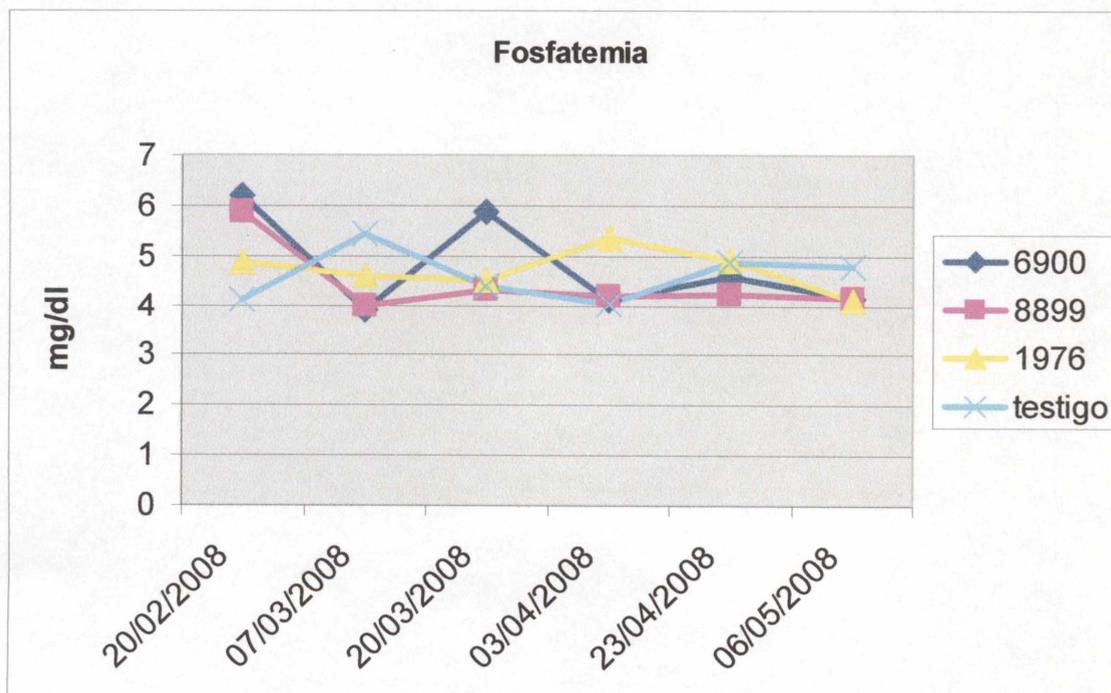


Figura 7. Evolución de los niveles de fósforo de los animales durante el período de experimentación.

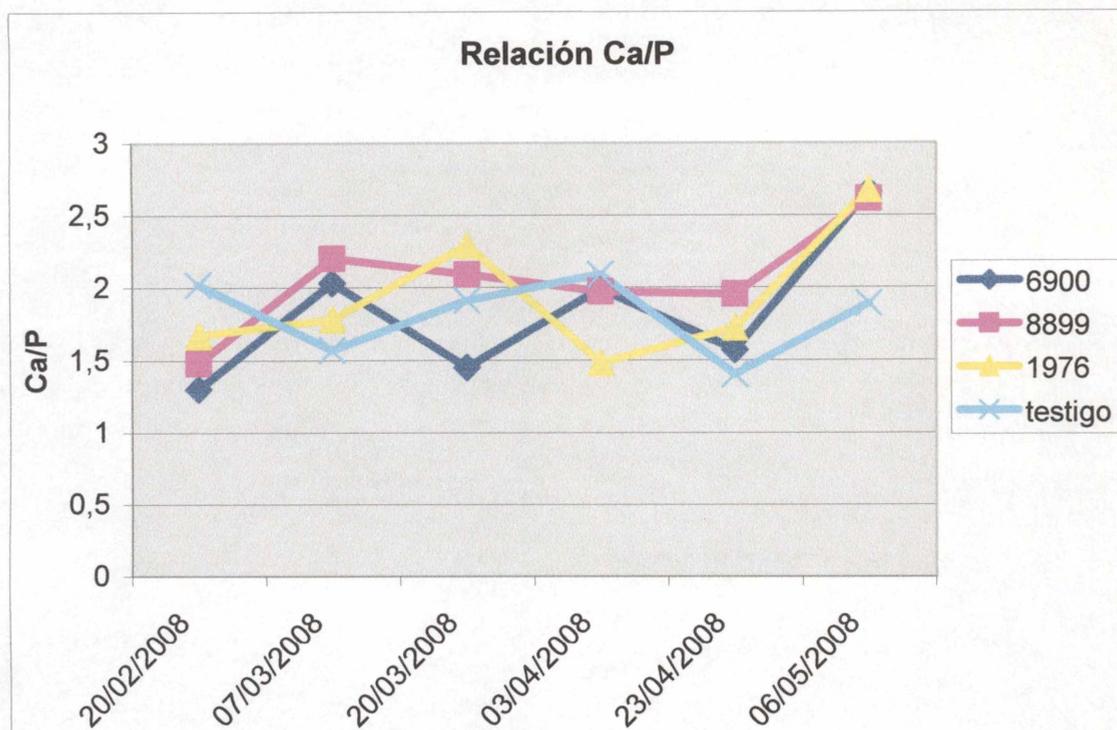


Figura 8. Relación Ca/P

En la radiografía de tórax en incidencia latero lateral se observó un aumento de la radiopacidad del cayado aórtico, mientras que el resto de las estructuras observadas en la radiografía no evidenciaron anomalías.

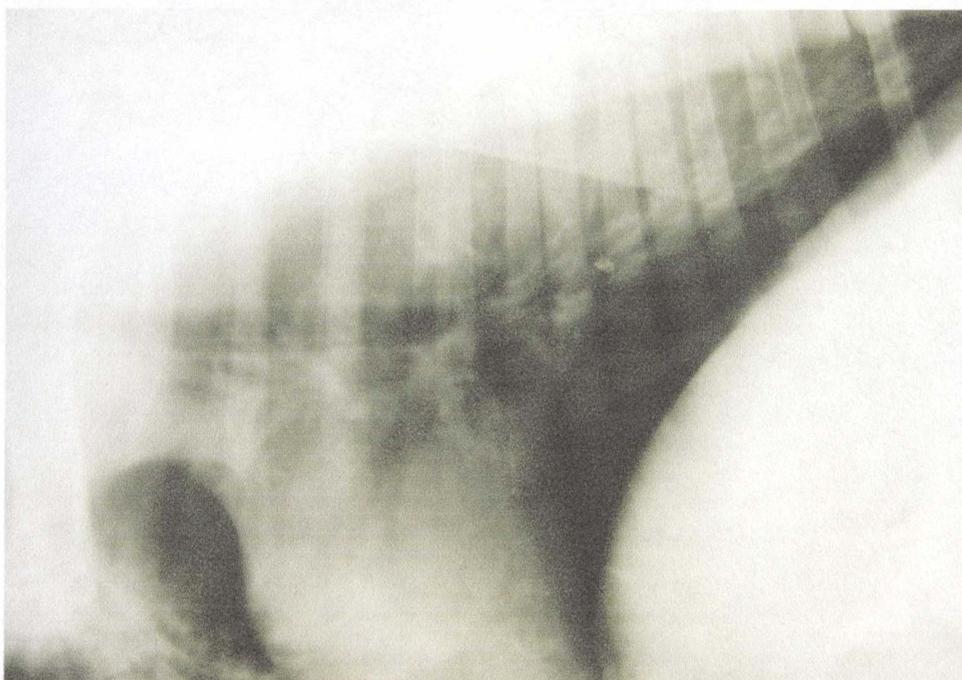


Figura 9. Radiografía de ovino intoxicado. Nótese la radiopacidad del cayado aórtico. Incidencia Latero-lateral.

En el estudio ultrasonográfico se notó un aumento en la ecogenicidad en la unión cortico-medular a nivel renal. Cabe destacar que no se observaron alteraciones en las válvulas cardíacas.



Figura 10. Ecografía de riñón izquierdo de uno de los animales afectados. Nótese un aumento de ecogenicidad en la unión cortico-medular. La misma fue obtenida usando transductor sectorial, a una intensidad de 5 MHz.

6.4.2. Lesiones macroscópicas

Las principales observaciones macroscópicas en la necropsia fueron:

Corazón y grandes vasos:

El pericardio no presentaban alteraciones, sí se notó un leve aumento del líquido pericárdico, presentando una coloración ambarino oscura.

Al corte del corazón no se observaron alteraciones a nivel de las paredes ventriculares. Al nivel de las aurículas se observaron pequeñas zonas de color blanquecino.

La aorta se presentaba endurecida al tacto, con resistencia al corte. Observándose la superficie interna rugosa y estriada, de color blanquecino.

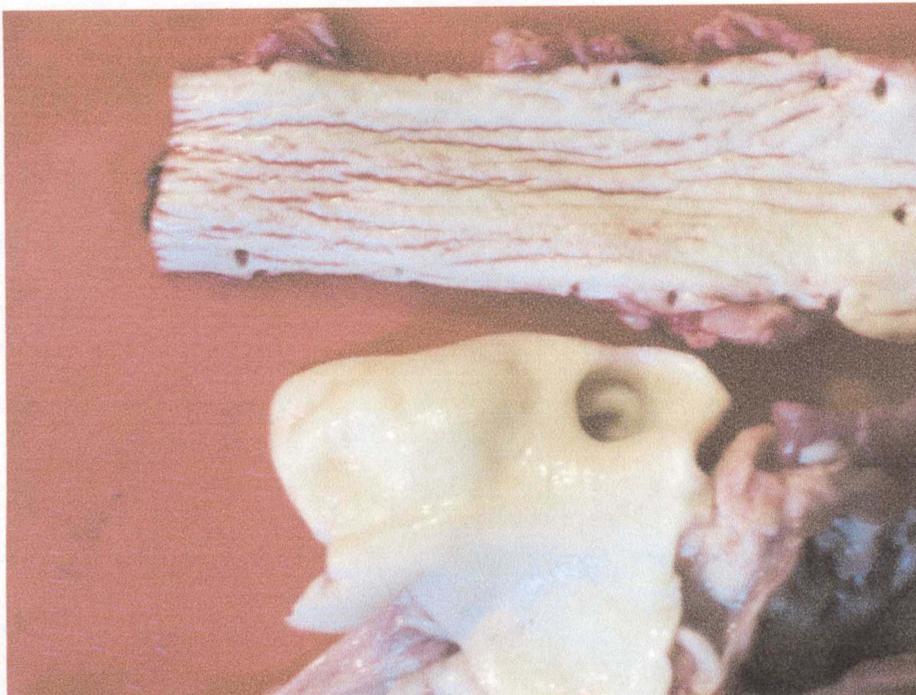


Figura 11. Aorta comparada. La superior corresponde a uno de los animales afectados, nótese la superficie interna rugosa y estriada de color blanquecino. La inferior corresponde al testigo.

Aparato respiratorio:

No se observaron alteraciones a nivel de las vías respiratorias altas, ni en pleuras.

Sobre los lóbulos pulmonares craneal y caudal, se observaron elevaciones de color blanquecino, al igual que en los bordes de los lóbulos caudal.

Aparato digestivo:

No se encontraron lesiones a nivel de boca y esófago. El contenido ruminal no presentaba anomalías. Tampoco se evidenciaron alteraciones a nivel de los distintos segmentos intestinales.

Hígado:

Se observó un puntillado blanquecino en la superficie y al corte presentaba congestión. El puntillado blanquecino se distribuía en todo el parénquima de forma difusa.

La vesícula biliar se mostró con contenido y color aparentemente normal.

Sistema urogenital:

La apariencia externa de los riñones era normal. La cápsula se desprendió sin particularidades, al corte se observó congestión y un leve puntillado próximo a la unión córtico - medular.

La vejiga no presentaba particularidades.

No se observaron alteraciones a nivel de bazo, tiroides, adrenales, páncreas, sistema nervioso central (SNC), articulaciones y tendones.

6.4.3. Lesiones histológicas

Fueron observadas degeneración y mineralización de las fibras elásticas de la capa íntima y media de aorta y otras arterias de mediano calibre. Células gigantes y macrófagos se evidenciaron en las paredes de las arterias.

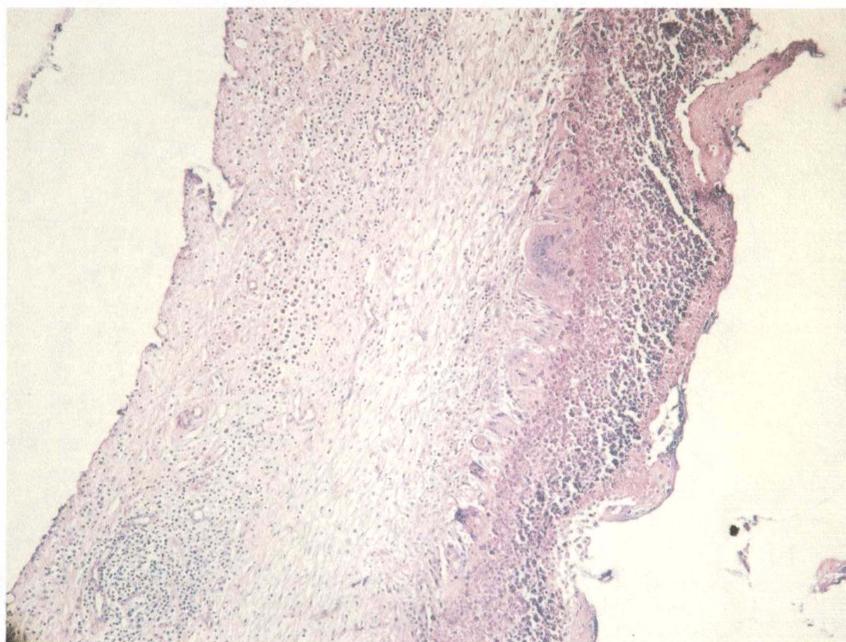


Figura 12. Focos de calcificación en arteria de ovino intoxicado. HE (40x).

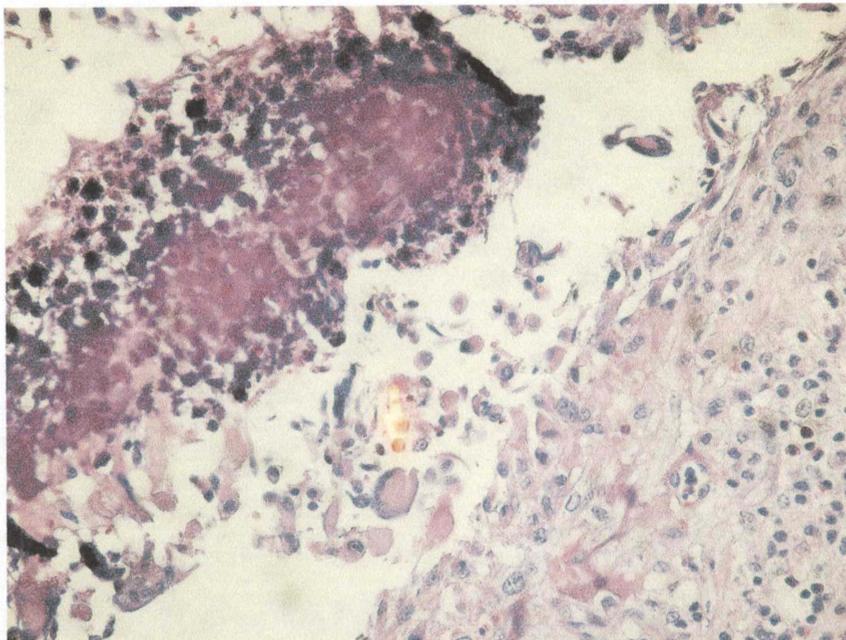


Figura 13. Calcificaciones y células gigantes en arteria de ovino intoxicado. HE (100x).

6.5 ANÁLISIS MICROHISTOLÓGICO

La *Nierembergia rivularis* presentó estomas anfistomáticos (en haz y envés), crucíferos (o anisocíticos), en el cual hay tres células acompañantes, de las cuales una es notoriamente mas pequeña que las otras que rodean al estoma. La cutícula es lisa, sin arrugas, con tricomas glandulares de 30 micras de longitud, en cabezuela, constituidos por una célula en el pie y cuatro células en la cabezuela.



Figura 14. Estomas de *N. rivularis* (100x).

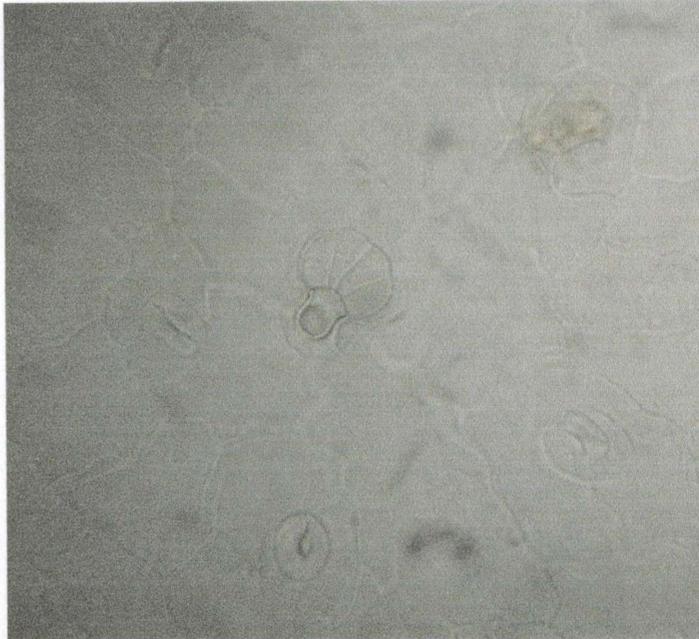


Figura 15. Tricomos de *N. rivularis* (100x).

6.6 ANÁLISIS QUÍMICO

La caracterización cromatográfica primaria de la estructura del colecalciferol se realizó por el método de cromatografía en capa fina (TLC). El mismo constató la presencia de VD_3 o una de sus variantes, en cloroformo como fase móvil. Esta molécula fue revelada con luz ultravioleta (UV) a 254 nm y con sulfato de cobre, quemada en estufa a 120° durante 10 minutos. Posteriormente se identificará y cuantificará el metabolito por cromatografía gaseosa.



Figura 16. TLC revelada con sulfato de cobre.

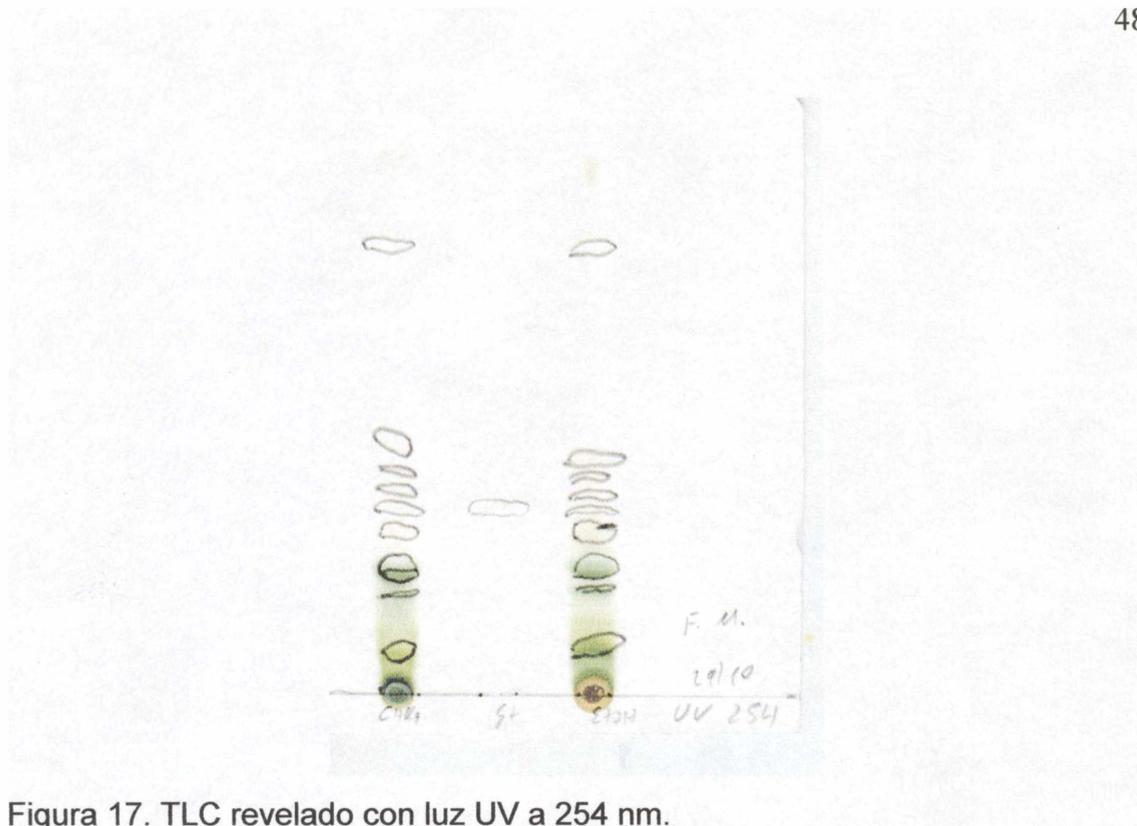


Figura 17. TLC revelado con luz UV a 254 nm.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la intoxicación natural y experimental por *N. rivularis* en ovinos en nuestro país, desde el punto de vista epidemiológico, clínico-patológico y químico. Hasta el momento, no existen trabajos científicos que indiquen la toxicidad de *N. rivularis*, a pesar de estar presente en otros países de la región con sistemas productivos similares (Vignoli-Silva, 2006).

El brote de calcinosis enzoótica ocurrido en ovinos en el departamento de Rivera en el año 2005 (García y Santos y col., 2006), coincide con la epidemiología de *N. veitchi* ampliamente estudiados en Rio Grande do Sul (Barros y col, 1992; Schild, 1993; Riet-correa, 1993b; Rissi, 2007).

En este caso la planta en estudio *N. rivularis* presenta semejanzas botánicas, coincidiendo su ciclo y período de floración con la anteriormente mencionada.

Otra especie a diferenciar en la zona estudiada, con características propias del género es la *N. calycina*, la cual no fue encontrada en los potreros del establecimiento en estudio.

Las condiciones climáticas de sequía reinante y escasez de forraje presentadas en el año del brote descrito, se asemejaron a las ocurridas durante el período de experimentación y son concordantes con las condiciones descritas en esta intoxicación (Barros y col, 1992; Schild, 1993; Riet-correa, 1993b; García y Santos y col., 2006; Rissi, 2007).

El diseño utilizado en este trabajo fue seleccionado de acuerdo a las características biológicas de baja altura de la planta, poca disponibilidad y gran palatabilidad. En cuanto a la especie animal utilizada en el ensayo, fue la misma que la descrita en la intoxicación natural (García y Santos y col., 2006).

El uso del cerco eléctrico en este diseño llevó a que los animales ingirieran la planta en estudio. Esto permitió cumplir con las condiciones necesarias para caracterizar una planta tóxica. Estas son el uso de la misma especie animal en la que ocurrió el brote natural y consumo por vía oral de planta fresca (Tokamia y col., 2000). Este tipo de diseño no nos permitió evaluar la dosis tóxica de la planta.

Los parámetros de frecuencia cardíaca, respiratoria, ruminal y temperatura se mantuvieron dentro de los límites fisiológicos, así como no se observaron particularidades en el resto del examen objetivo general. A diferencia del trabajo de Riet-Correa y col. (1987), en donde la *N. veitchi* produce anomalías en la conformación esquelética como xifosis y miembros anteriores levemente flexionados resultando en una marcha rígida.

Al finalizar la etapa de campo, cuando los animales intoxicados fueron introducidos con la majada y el control, se observó que los mismos quedaban retrasados, pero sin presentar alteraciones en la marcha.

Las variaciones de peso observadas en la gráfica 1, se atribuyeron a los factores climáticos durante el ensayo, que condicionaron la disponibilidad de forraje, tanto en el potrero problema como en el potrero control.

Los picos de calcemia observados en la gráfica 2, coinciden con picos de forraje y aumentos de la cantidad de *N. rivularis* en los cuadros. Otros trabajos mencionan hipercalcemias constantes, enmarcados en una administración regular de planta calcionogénica (Riet-Correa, 1987; Riet-Correa, 1993b).

Según otros autores (Greco, 2005; Guyton, 2007), la regulación de la homeostasis del calcio ocurre dentro de límites muy estrechos de tiempo, no siendo mayores a una hora. Por lo tanto, si la oferta de planta no es constante, como lo ocurrido en nuestro diseño experimental, podemos afirmar que la calcemia presenta variaciones en el curso de la intoxicación.

La fosfatemia no presentó variaciones significativas en el transcurso de la experimentación. En cambio la relación calcio fósforo varió en función de los picos de calcemia.

En la radiología se evidenciaron signos de calcificación, coincidiendo con estudios radiológicos anteriormente descritos en caprinos (Braun y col., 2000; Soto, C. 2005. Comunicación personal).

El estudio ultrasonográfico reveló alteraciones a nivel renal, como las observadas en otros diagnósticos de calcinosis (Soto, C. 2005. Comunicación personal; Fritz y col., 2007).

Los hallazgos macroscópicos e histológicos, son característicos de los casos descritos de calcinosis enzoótica experimentales y naturales (Eckell y col. 1960; Carrillo y Worker, 1967; Dobereiner y col., 1971; Riet-Correa y col., 1975; Gill y col., 1976; Neumann y col., 1977; Riet-Correa y col., 1987; Schild, 1993; Gimeno, 2000; Barros y Gimeno, 2000; Mello, 2003; Barros y col., 2006; García y Santos y col., 2006; Rissi y col., 2007; García y Santos y col., 2007).

Las lesiones observadas en este experimento, fueron menos relevantes comparadas con las observadas en el brote natural ocurrido en el mismo establecimiento (García y Santos y col., 2005). Esto puede atribuirse al tiempo de permanencia de los ovinos en la pastura del experimento, cantidad de planta presente y consumida y/o a la susceptibilidad individual de los animales.

Los tricomas y fragmentos de epidermis encontrados en la materia fecal de los ovinos en experimentación, nos permite afirmar el consumo de la *N. rivularis*. Esta técnica fue utilizada en otros trabajos experimentales con tales fines (Panter et al, 1987; Yagueduú et al, 1998; Yagueduú et al, 2000; García y Santos et al, 2004).

Se constató presencia de metabolitos de vitamina D3 o alguna de sus variantes en los estudios químicos, como ocurre en otras plantas calcinogénicas, tales como *Solanum glaucophyllum (malacoxylon)* (Carrillo y Worker, 1967; Camberos y Davis, 1969; Riet-Correa y col., 1975; Gimeno, 1977; Rivero y col., 1989; Jubb y col., 1990), *Nierembergia veitchii* (Barros y col., 1970; Riet-Correa y col., 1987; Riet-Correa y col., 1993b; Rissi y col., 2007), *Cestrum diuimum* (Krook y col., 1975a; Krook y col., 1975b), *Trisetum flavescens* (Braun y col., 2000; Dirksen y col., 2003), *Solanum torvum* (Morris y col., 1979), *Stenotaphrum secundatum* (Arnold y Fincham 1997), *Solanum esuriale* (O'Sullivan, 1976) y *Solanum verbascifolium* (Tustin y col., 1973, citado por Mello, 2003).

Si bien los objetivos están cumplidos, actualmente un equipo multidisciplinario de Facultad de Veterinaria y Facultad de Química se está encargando de la cuantificación de los principios activos. Esto continúa muchas líneas de investigación como la determinación de la dosis tóxica de la planta y el estudio de muchas plantas potencialmente calcinogénicas de nuestro país.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento, podemos afirmar que la *Nierembergia rivularis* es una maleza tóxica para ovinos.

La presencia de metabolitos de vitamina D₃ o sus variantes y cuadro clínico-patológico observado, permiten afirmar que esta planta es la causante del brote de calcinosis enzoótica del año 2005.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Arnold, RM y Fincham, IH (1997). Manchester wasting disease: a calcinosis caused by a pasture grass (*Stenotaphrum secundatum*) in Jamaica. Trop Anim Health and Prod 29, 174-176.
- 2) Barros, SS, Soraes, MP, Gimeno, EJ. (2006) Macrophages and Giant cell proliferation associated with bone protein synthesis and calcification in the thrachea and bronchi of rabbits intoxicated with *Solanum glaucophyllum*. Vet Pathol. 43:494-499.
- 3) Barros, SS, Pohlenz, J, Santiago, C. (1970). Zur Kalzinose beim Schaf. Dtsch Tierarztl Wschr. 77: 321-356. Abstract.
- 4) Braun, U, Diener, M, Hilbe, M, Busch, M, Bischoff, M, Brosi, G. (2000). Enzootic calcinosis in 16 cows from 6 dairy farms in Unterengadin. Schweiz Arch Tierheilkd. 142 (6):333-338.
- 5) Burkart, A. (1979). Parte V: Dicotiledóneas metaclamídeas. En: Flora ilustrada de Entre Ríos. 1ª. Colección Científica del INTA, pp. 434-443.
- 6) Camberos, HR, Davis, GK. (1969). Acción de *Solanum malacoxylon* sobre balance mineral en ovinos. Gaceta Veterinaria 3: 466-474.
- 7) Carrillo, BJ, Worker, NA. (1967). Enteque seco: arteriosclerosis y calcificación metastásica de origen tóxico en animales a pastoreo. Revista Investigaciones Agropecuarias INTA Argentina. 4(2): 9-30.
- 8) DIEA/MGAP, (2006). Anuario estadístico agropecuario 2007. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/diea/anuario2007/htm/index.htm> Visitado 16 de Setiembre de 2007.

- 9) Dirksen, G, Sterr, K, Hermanns, W. (2003). Enzootic calcinosis in sheep after consumption of golden oat grass (*Trisetum flavescens* L., P. B.). Dtsch Tierarztl Wschr. 110(12): 475-483.
- 10) Dobereiner, J, Tokamia, CH, Costa, JBD, Campos, JLE, Dayrell, MS. (1971). "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal de Mato Grosso. Pesq. Agrop. Bras. 6: 91-117.
- 11) Dusi, J. L. (1949). Methods for the determination of food habits by plants microtechnique and histology and their application too cottontail rabbit food habits. J. Wild. Manage. 13: 295-298.
- 12) Franz, S, Gasteiner, J, Schilcher, F, Baumgartner W. (2007). Use of ultrasonography to detect calcifications in cattle and sheep fed *Trisetum flavescens* silage. Vet Rec. 161 (22): 751-754.
- 13) García y Santos, C, Pérez, W, Mosca, V, Pereira, R, Seoane, A, Rodríguez, M, Moraes, J, Rivero, R. (2006). Calcinosis Enzoótica en ovinos de Uruguay XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp. 195-196.
- 14) Garcia y Santos, MC, 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. XXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp 284-285.
- 15) García y Santos, MC, Verdes, JM, Moraña, A, Gutierrez, F, Battes, D, Capella, A, Bartolomé, J. (2004). Análisis microhistológico de epidermis de *Solanum bonariense* como método diagnóstico durante la intoxicación experimental en terneros. Pesq Vet Bras. 24(Supl):24-25.
- 16) Gill, BS, Singh, M, Chopra, AK. (1976). Enzootic calcinosis in sheep: clinical signs and pathology. Am J Vet Res. 37(5): 545-552.

- 17) Gimeno, EJ. (2000). Calcinosis enzoótica en rumiantes: un problema vigente de la ganadería nacional. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Sesión pública extraordinaria. Tomo LIV. Buenos Aires.
- 18) Gimeno, EJ. (1977). Estudios sobre "Enteque seco". Algunas consideraciones históricas. Veterinaria Argentina 39 (322): 382-388.
- 19) Greco, D y Stabenfeldt, GH. (2005). En: Cunningham, JG. Fisiología Veterinaria. 3ª. Madrid, Ed. Elsevier, pp. 341 – 372.
- 20) Greissinger, CS. (2004). Bestimmung der vitamin D- aktivität von calcinogenen pflanzen im Wachteleischalentest. Inaugural – dissertation zur erlangung der tiermedizinischen doktorwürde der tierärztlichen fakultät der Ludwig – Maximilians – Universität München.
- 21) Gurkupal S, Gill BS, Randhawa NS. (1976). Enzootic Calcinosis in Sheep: Soil-Plant-Animal Relationship. Am J Vet Res. 37(5): 553-556
- 22) Guyton, AC y may, JE. (2007). Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y fósforo, vitamina D, huesos y dientes. En: Guyton AC y Hall JE. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. Madrid, ed Elsevier, pp. 978 – 995.
- 23) Holechek, JL, Vayra, M. y Piper, RD. (1982). Botanical composition determination of range herbivore diets: a review. J. Wild. Manage. 35: 309-315.
- 24) Jubb, KVF, Kennedy, PC, Palmer, N. (1990). Patología de los animales domésticos. 3ª ed. Montevideo, ed Hemisferio Sur.
- 25) Kramer, JW. (2000). En: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Shalm's Veterinary Hematology. 5ª ed. Montreal, ed Lippincott, Williams y Wilkins, pp. 1075-1084.

- 26) Krook, L, Wasserman, RH, McEntee, K, Brokken, TD, Melbourne, TB. (1975b). *Cestrum diurnum* poisoning in Florida cattle. *Cornell Vet.* 65:10:557-575.
- 27) Krook, L, Wasserman, RH, Shivley, JN, Tashjian, AH Jr, Brokken, TD, Morton, JF. (1975a). Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: implication of the shrub, *Cestrum diurnum*, as the causative agent. *Cornell Vet.* 65:26-56.
- 28) Mederos, A, Easton, C, Paullier, C, Gago, M, Franchi, M, Bove, R. (1991). Comprobación de intoxicación por *Nierembergia repens* en ovinos del Uruguay. 9ª Jornadas de Ovinos. Tacuarembó, Uruguay.
- 29) Mello, JR y Habermehl, GG. (1998). Effects of calcinogenic plants-- qualitative and quantitative evaluation. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 105(1):25-29.
- 30) Mello, JRB. (2003). Review: Calcinosis — calcinogenic plants. *Toxicon* 41: 1 – 12.
- 31) Montossi, F, Ligurina, G, Santamarina, I, Berretta, E. (2000). Selectividad animal y valor nutritivo de la dieta de ovinos y vacunos en sistemas ganaderos: Teoría y Práctica. Serie técnica INIA Tacarembó. 113. 108 p
- 32) Moraña, JA, Barros, SS, Driemerer, D, Flôres, YA. (1994). Gastropatía em coleos experimentalmente inducida pela planta calcinogênica *Solanum malacoxylon*. *Pesq Vet Bras.* 14(1):35-42.
- 33) Morris, KM, Simonite, JP, Pullen, L, Simpson, JA. (1979). *Solanum torvum* as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea. *Res Vet Sci.* 27(2):264-266.
- 34) Neumann, F, Nobel, TA, Bogin, E. (1997). Enzootic calcinosis in sheep and C-cells hyperplasia of the thyroid. *Vet Rec.* 101(18):364-366.



35) Oliveira Simões Claudia Maria. (1999). Farmacognosia: Da planta ao medicamento. Pelotas, Ed. Univ. Universidad Federal de Río Grande Do Sul.

36) Panter, KE, Ralph, MH, Smart, RA, Duelke, B. (1987). Death camas poisoning in sheep: A case report. *Vet Human Toxicol.* 29(1):45-48.

37) Riet-Correa, F y Medeiros, RMT. (2000). Toxic plants for ruminants in Brazil and Uruguay: economic impact, control measures and Public Health implications. Congreso Mundial de Buiatria, XXI, Punta del Este, Uruguay, p.11.

38) Riet-Correa, F y Medeiros, RMT. (2001). Intoxicações por plantas em rumiantes no Brasil e no Uruguai: importancia económica, controle e riscos para a saude publica. *Pesq. Vet. Bras.*; 21(1): 38-42.

39) Riet-Correa, F y Rivero, R. (2005). Importancia económica y control de las intoxicaciones por plantas. 12th Internacional Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (ISWAVLD) & Oie Seminal on Biothecnology. 16-19 de noviembre de 2005. Radisson Hotel, Montevideo, Uruguay. CD ROM.

40) Riet-Correa, F, Mendez, MC, Schild, AL, Petiz, CA. (1993b). Enzootic calcinosis in sheep. Experimental reproduction with *Nierembergia veitchii* (Solanaceae) *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2): 21-24.

41) Riet-Correa, F, Méndez, MC, Schild, AL. (1993a). Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Pelotas, Ed. Hemisfério Sur.

42) Riet-Correa, F, Schild, AL, Mendez, MC, Wasserman, R, Krook, L. (1987). Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq. Vet. Bras.* 7(3): 85-95.

- 43) Riet-Correa, F, Riet-Correa, I, Bellagamba, C. (1975). Calcificación metastásica enzoótica (enteque seco) en bovinos del Uruguay. *Veterinaria* 12(60): 15-23.
- 44) Rissi, D, Rubia, R, Pierezan, F, Kommers, GD, Lombardo de Barros, CS. (2007). Intoxicação em ovinos por *Nierembergia veitchii*: observações em quatro surtos. *Ciência Rural*. 37(5): 1393-1398.
- 45) Rivero, R, Quintana, S, Feola, 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: 1- 73.
- 46) Rivero, R, Riet-Correa, F, Dutra, F. (2000). Toxic plants affecting cattle and sheep in Uruguay. Congreso Mundial de Buiatria, XXI, Punta del Este, Uruguay, p10.
- 47) Tokarnia, CH y Döbereiner, J. (1974). "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal do Mato Grosso. II. Estudos complementares. *Pesq. Vet. Bras.* 9: 53-62.
- 48) Tokarnia, CH, Dobereiner, J, Peixoto, PV. (2000). "Plantas Tóxicas do Brasil". Rio de Janeiro, Ed Helianthus,. 297 p.
- 49) Tustin RC, Pienaar CH, Schmidt JM, Faul A, van der Walt K, Boyazoglu PA, de Boom HP. (1973). Enzootic calcinosis of sheep in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 44(4):383-395.
- 50) Vignoli-Silva, M y Mentz, LA. (2006). O gênero *Nierembergia* Ruiz & Pav. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér Bot.* 61(1-2):139-155.
- 51) Wallis, TE. (1968). En: Wallis, TE, *Microscopía Analítica*. 1ª. Barcelona, ed Acribia, pp. 140.

- 52) Wasserman, RH. Active vitamin D-like substances in *Solanum malacoxilon* and other calcinotic plants. *Nutrition Reviews* (1975); 33: 1-5.
- 53) Yagueduú, C, Cid, MS, Lopez, T, Brizuela, MA. (2000). Exactitud y precisión en la cuantificación por microanálisis de *Cestrum Parqui* L'Herit en el contenido digestivo de ovinos en pastoreo. *Vet Arg.* 17 (170):757-767.
- 54) Yagueduú, C, Cid, MS, Lopez, T. (1998). Microhistological análisis of sheep gastrointestinal content to confirm poisonous plant ingestión. *J Range Manage.* 51:655-660.
- 55) Zanoniani, R y Ducamp, F. (2002). Evaluación preliminar de *Eringium horridum* en un sistema pastoril ganadero, XIX Reunión del Grupo Técnico en Forrajas del Cono Sur, Zona Campos, Mercedes, Corrientes, Editores Altuve, S. M.y Pizzio, R. M. 150p.

10. ANEXO

Cuestionario realizado a los productores y veterinarios de la zona.

- ¿Cuál es el rubro principal en el establecimiento?
- ¿Posee asesoramiento profesional? ¿de que tipo?
- ¿Cría ovinos en el establecimiento?
- ¿El establecimiento tiene costas sobre el Río Yaguarí o alguno de sus afluentes?
- ¿Ha notado la presencia de la planta sospechosa? (Se realiza una breve descripción de la misma y se muestran ejemplares)
- ¿Pastorea ovinos en potreros ubicados en las costas?
- ¿Qué categorías de ovinos pastorea?
- ¿Qué tipo de pastoreo realiza? ROTATIVO / CONTÍNUO
- ¿Cuál es el tiempo de permanencia de los ovinos en dichos potreros?
- ¿Há notado un menor rendimiento de dichos animales?
- ¿A que le atribuiría ese menor rendimiento?
- En caso de haber tenido muertes, ¿se ha llegado a un diagnóstico?