

UFSM

Dissertação de Mestrado

**PERFIL OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS DE
BOVINOS INTOXICADOS POR *Senecio sp.***

Carlos Bondan

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**PERFIL OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS DE
BOVINOS INTOXICADOS POR *Senecio sp.***

**elaborado por
Carlos Bondan**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária,
Área de concentração em Clínica Médica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Marcelo da Silva Cecim

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de Mestrado

**Perfil oxidativo de eritrócitos de bovinos intoxicados
por *Senecio sp.***

elaborado por
Carlos Bondan

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcelo da Silva Cecim
(Presidente/Orientador)

Julio Cesar Mendes Soares

Eraldo Lourenso Zanella

Santa Maria, 10 de fevereiro de 2006.

Agradecimentos

A minha família, em especial a Cassiane (minha esposa), minha mãe e meu irmão pelo incentivo e apoio que sempre me deram, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meu objetivo.

A todos os meus amigos e colegas que tive o prazer de conviver durante a Pós-Graduação.

Ao meu orientador Professor Dr. Marcelo da Silva Cecim, por ter acreditado em mim.

Ao meu Co-Orientador Professor Dr. Julio Cesar Mendes Soares, pelo incentivo e perseverança. Com você aprendi a ter ambição e lutar pelos ideais que julgamos bons para nós. O tenho como um grande amigo.

Ao Centro de Grandes Animais onde realizei a parte experimental deste trabalho, em especial ao Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Animal, ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário em nome da professora Dr. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes e ao Laboratório de Patologia Animal, pelas análises histológicas, em nome da Professora Dr. Dominguita Lühers Graça.

A Universidade Federal de Santa Maria.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Sumário

Agradecimentos.....	3
Índice de figuras.....	6
Índice de tabelas.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Apresentação.....	10
Resumo.....	11
1. Introdução.....	14
2. Revisão bibliográfica.....	16
2.1. <i>Senecio</i> sp, distribuição e descrição da planta.....	16
2.2. Sinais clínicos.....	17
2.3. Alterações macroscópicas e microscópicas.....	18
2.4. Métodos de diagnóstico.....	19
2.4.1. Biópsia hepática.....	19
2.4.2. Análises clínicas.....	20
2.5. Toxicidade dos alcaloides pirrolizidínicos.....	21
3. Radicais livres.....	24
3.1. Radical superóxido.....	25
3.2. Radical hidroxila.....	26
3.3. Peróxido de hidrogênio.....	27
3.4. Produção de espécies reativas do oxigênio favorecidas pelos íons ferro e cobre.....	27

4. Mecanismo de ação dos radicais livres.....	29
4.1. Estresse oxidativo.....	30
5. Mecanismos de defesa antioxidante enzimático.....	31
5.1. Superóxido dismutase (SOD).....	32
5.2. Catalase (CAT).....	33
5.3. Glutaciona peroxidase.....	33
6. Mecanismos de defesa antioxidante não enzimático.....	34
7. Objetivos.....	35
8. Artigo Científico.....	36
9. Considerações Finais.....	56
10. Referências bibliográficas.....	58
11. Anexo.....	64

Índice de figuras

Figura 1.	Corte histológico de tecido hepático de uma novilha do grupo 1 demonstrando fibrose, hiperplasia de ductos biliares e megalocitose devido a intoxicação por <i>Senecio sp.</i> H&E, objetiva X10.....	54
------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Índice de tabelas

Tabela 1. Resultados dos testes hematológicos e bioquímicos para avaliar o estresse oxidativo nos eritrócitos de bovinos intoxicados por <i>Senecio sp</i> (grupo 1) comparados com o grupo controle (grupo 2). Os dados são expressos em média \pm SD.....	55
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de abreviaturas

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CAT – Catalase

Cu^+ - Íon cuproso

Cu^{++} - Íon cúprico

EROs/ROS - Espécies reativas de oxigênio

FA – Fosfatase alcalina

Fe^{++} - Íon ferroso

Fe^{+++} - Íon ferrico

g - Gramas

GGT – Gama glutamiltransferase

GSH – Glutaciona

GSHpx – Glutaciona peroxidase

GSSG – Glutaciona oxidada

GS – Glutaciona reduzida

GRd – Glutaciona redutase

H_2O - Água

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HO^\bullet – Radical hidroxila

kg – Quilograma

L – Litro

O_2 - Oxigênio

O_2^\bullet – Radical ânion superóxido

Se - Selênio

-SH – Grupos sulfidrílicos

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

UI – Unidades internacionais

Zn – Zinco

α - Alpha

β - Beta

Apresentação

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, os quais se encontram no item ARTIGO CIENTÍFICO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Conclusões e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta dissertação.

Resumo

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

Estresse oxidativo em eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp.*

Autor: Carlos Bondan
Orientador: Marcelo da Silva Cecim
Co-Orientador: Julio César Mendes Soares
Santa Maria, RS, 2006.

Intoxicação causada por *Senecio sp* é caracterizada por danos irreversíveis às células hepáticas e pode estar associada com estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da intoxicação por *Senecio sp* sobre a peroxidação lipídica, defesa antioxidante e resistência osmótica dos eritrócitos em bovinos. Amostras sanguíneas de 30 animais intoxicados (grupo 1) e 30 animais sadios (grupo 2) foram analisadas. O diagnóstico de intoxicação por *Senecio sp* foi baseado nas lesões histopatológicas verificadas através de biópsia hepática. Os seguintes parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo nos eritrócitos foram determinados: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) e grupamentos sulfidris não-proteicos (NPSH). Fragilidade osmótica dos eritrócitos também foi avaliada. A concentração de TBARS e atividade da CuZnSOD foi significativamente maior ($p < .001$) no grupo 1 quando comparado com o grupo 2. A concentração dos grupamentos NPSH nos eritrócitos foi significativamente menor ($p < .03$) no grupo 1 quando comparado o grupo 2. A fragilidade osmótica foi maior nos eritrócitos do grupo 1 quando comparada com o grupo 2 ($p < .001$). O resultado deste estudo indica que a intoxicação por *Senecio sp* causa um aumento na peroxidação lipídica, oxidação dos grupamentos NPSH, e conseqüentemente, estresse oxidativo nos eritrócitos de bovinos que pode contribuir para a hemólise. Estes achados podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no dano celular em animais intoxicados por *Senecio sp*.

Palavras-chave: Bovinos, hemólise, peroxidação lipídica, grupos sulfidris não protéicos, estresse oxidativo, células vermelhas do sangue, Senecio sp, superóxido dismutase.

Abstract

*Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil*

***Oxidative stress in the erythrocytes of cattle intoxicated with
Senecio_sp.***

*Author: CARLOS BONDAN
Adviser: MARCELO DA SILVA CECIM
Santa Maria, february, 2006*

Intoxication caused by *Senecio sp* is characterized by irreversible damage to liver cells and may be associated with oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the effects of intoxication by *Senecio sp* on lipoperoxidation, antioxidant defenses, and the osmotic resistance of erythrocytes in cattle. Blood samples from 30 intoxicated animals (group 1) and 30 samples from healthy animals (group 2) were analyzed. The diagnosis of poisoning by *Senecio sp* was based on histopathologic lesions verified through hepatic biopsy. The following biochemical parameters of oxidative stress in the erythrocytes were determined: thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) activity, and nonprotein sulfhydryl (NPSH) groups. Erythrocyte osmotic fragility also was evaluated. TBARS concentration and CuZnSOD activity were significantly ($P < .001$) higher in group 1 when compared with group 2. The concentration of erythrocyte NPSH groups was significantly ($P < .03$) lower in group 1 when compared with group 2. Osmotic fragility was more pronounced in the erythrocytes of group 1 when compared with group 2 ($P < .001$). The results of this study indicate that poisoning by *Senecio sp* causes a increase in lipoperoxidation, oxidation of NPSH groups, and consequently, oxidative stress in bovine erythrocytes that may contribute to hemolysis. These findings may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in cell damage in animals intoxicated by *Senecio sp*.

Key Words: Bovine, hemolysis, lipid peroxidation, nonprotein sulfhydryl, oxidative stress, red blood cell, *Senecio sp*, superoxide dismutase.

1. Introdução:

Senecio sp é um gênero de planta que cresce em várias regiões do planeta, está adaptada a diferentes tipos de solo, e se desenvolve preferencialmente em terrenos arenosos (MATTOK & JURKES, 1987). Plantas deste gênero apresentam uma grande importância na pecuária devido sua ação tóxica que ocasiona diminuição na produção, morte de animais e custos com medidas de controle e profilaxia (RIET-CORREA et al., 1993).

A ação tóxica do *Senecio sp* ocorre devido a presença dos alcalóides pirrolizidínicos e substâncias voláteis como indoís e terpenos responsáveis pelas lesões, principalmente, a nível hepático (ZEINSTEGER et al., 2003). As lesões histopatológicas caracterizam-se por fibrose hepática, hiperplasia de ductos biliares, variados graus de colestase e hepatomegalocitose (DRIEMEIER & BARROS, 1992).

A detoxificação dos alcalóides pirrolizidínicos ocorre a nível hepático e durante este metabolismo, que utiliza principalmente as enzimas do citocromo P-450, há a geração de uma grande quantidade de metabólitos tóxicos e radicais livres (FU et al., 2002).

VENDEMIALE et al., (2001) demonstraram que a ação dos radicais livres sobre as células hepáticas tem um importante papel na agressão celular e na

formação de tecido conjuntivo fibroso. HUAN et al., (1998) estudaram a suscetibilidade de diferentes espécies animais aos alcalóides pirrolizidínicos. As espécies animais que apresentaram os maiores níveis de glutathione foram os mais resistentes aos efeitos tóxicos quando comparados a outras espécies com níveis menores deste antioxidante, sugerindo assim, o envolvimento de danos oxidativos nas lesões produzidas pelas pirrolizidinas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a peroxidação lipídica ocasionados pelos alcalóides pirrolizidínicos nos eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp.* Assim como, avaliar o *status* antioxidante destes animais e estabelecer uma relação entre geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) e a manutenção do *status* antioxidante pelo fígado.

2 – Revisão bibliográfica

2.1 *Senecio sp*, distribuição e descrição da planta.

Plantas do gênero *Senecio sp* pertencentes à família das *Compositae* (*Asteraceae*) são amplamente conhecidas e seus efeitos descritos em vários países sob diversas denominações. Na Argentina mais de 300 espécies são conhecidas (GALLO, 1987). Vários casos de intoxicação pela ingestão de *Senecio sp* tem sido reportado. Em 1902, na África, uma doença hepática foi descrita em função do consumo desta planta pelos bovinos (CUSHNY & WATT, 1920). Outros casos foram descritos na Inglaterra (WILMOT & ROBERTSON, 1920), Estados Unidos (DAVIS, 1957), Argentina (CARRILO et al., 1976; VENZANO & VOTTERO, 1982; ARAYA et al., 1986), Uruguai (PODESTA et al., 1977) e Austrália (WALKER & KIRKLAND, 1981). No Brasil a primeira descrição de seneciose foi feita por CARVALHO & MAUGE (1946).

Em nosso país são conhecidas cerca de 128 espécies de *Senecio sp*, sendo mais freqüentes as espécies *Senecio brasiliensis* conhecida popularmente como Tasneirinha, Capitão, Flor das Almas e no Rio Grande do Sul, Maria Mole (MENDÉS, 1993).

O desenvolvimento das plantas depende de condições ambientais favoráveis como umidade, temperatura e luz. O déficit hídrico, manejo do solo e algumas espécies de insetos podem alterar o ciclo das plantas e conseqüentemente diminuir os extingui-las do ambiente (KARAM et al., 2002).

O princípio ativo responsável pela intoxicação foi isolado e caracterizado como alcalóides pirrolizidínicos (McLEAN, 1970) e substâncias voláteis como indoís e terpenos (ROMERO et al., 2002). Plantas das famílias *Compositaceae*

(*Asteraceae*), *Leguminaceae* e *Borraginaceae* apresentam alcalóides pirrolizidínicos, porém, os gêneros *Senecio*, *Crotalária*, *heliotrópium*, *Amsinkia*, *Echium*, *Cynoglossum* e *Trichodesma* são as que contem maior quantidade da substância (BULL et al., 1968).

O diagnóstico de bovinos intoxicados no Rio Grande do Sul ocorre em áreas invadidas por *S. brasiliensis*, *S. selloj*, *S. cisplatinus*, *S. leptolobus*, *S. oxyphylus* e *S. tweediei* (MENDÉZ, 1993). O Consumo da planta ocorre com maior frequência no outono e inverno devido as condições climáticas que favorecem o desenvolvimento da planta associado a baixa disponibilidade de forragens (BARROS et al., 1987).

2.2 Sinais clínicos

Segundo MENDÉZ, (1993) há uma grande variação quanto a sintomatologia clínica em bovinos intoxicados pêlos alcalóides pirrolizidínicos. Para melhor entendimento os sinais clínicos são divididos em dois grupos: No primeiro grupo estão os animais que apresentam agressividade e em alguns casos incoordenação motora. Distúrbios gastrointestinais podem ser evidenciados como tenesmo e ocasionalmente prolapso retal. Diarréia quando presente, cursa um quadro clínico de 2 a 7 dias sendo que alguns animais podem recuperar-se voltando a apresentar esse sinais clínicos posteriormente, mas a maioria morrem em 24 a 72 horas.

No segundo grupo o quadro clínico se caracteriza pôr emagrecimento progressivo, diarréia pode estar presente ou não e quando presente ocorre por vários meses.

Antes da morte os animais pode apresentar todas as sintomatologia descritas no primeiro e segundo grupo ou simplesmente permanecem em decúbito até a morte.

Ascite, fotossensibilização, icterícia e edema dos membros e barbela também são sinais clínicos que podem estar presentes em animais intoxicados pelos alcalóides pirrolizidínicos (BARROS et al., 1987; DRIEMEIER et al., 1991).

TOKARNIA & DOBEREINER, (1984) relatam que as fezes podem apresentar-se recobertas de muco e às vezes apresentar sangue. Nos casos crônico, os animais apresenta pêlos arrepiados (WALKER & KIRKLAND, 1981). Alguns animais evidenciam um odor adocicado e desagradável que exala pela pele caracterizado por DRIEMEIER & BARROS, (1992) como um odor acre-doce. Esse odor ocorre em graus variados presente principalmente na pele da porção cervical e cernelha dos bovinos. Outros sinais neurológicos como sonolência, cegueira parcial, excitabilidade, pressão da cabeça contra objetos, andar em círculos, dismetria, andar sem rumo e tremores musculares também podem ser evidenciados (DRIEMEIER, 1990).

A seneciose se caracteriza por ser uma doença progressiva, os animais podem desenvolver sinais clínicos vários meses após a ingestão da planta e as mortes ocorrem de forma esporádica e durante um longo período de tempo (BARROS et al., 1987; DRIEMEIER et al., 1991).

2.3 Alterações macroscópicas e microscópicas

As alterações macroscópicas se caracterizam pelo edema no mesentério, abomaso e intestinos, líquido na cavidade abdominal e hemorragias peri e endocárdicas. O fígado apresenta-se algumas vezes, aumentado de tamanho, e

outras normais ou diminuído, de coloração esbranquiçada ou amarelado e, ao corte, observa-se aumento na consistência e com áreas arredondadas e esbranquiçadas, intercaladas com áreas de coloração avermelhada. Às vezes observam-se áreas hemorrágicas e proliferação de tecido fibroso. A vesícula biliar está aumentada de tamanho, com parede engrossada e edemaciada e, em alguns casos, observa-se nódulos de 2 a 3 mm distribuídos em toda a mucosa (BARROS et al., 1987; DRIEMEIER et al., 1991).

Os alcalóides pirrolizidínicos causam no fígado uma lesão progressiva caracterizada por edema, fibrose difusa, proliferação de células epiteliais dos ductos biliares, megalocitose e necrose (BULL et al., 1968; HOPPER, 1978). Em alguns animais observa-se nódulos regenerativos com hepatócitos aparentemente normais. No sistema nervoso central observam-se lesões de encefalopatia hepática caracterizada por microcavitações localizadas na substância branca, no limite entre esta e a substância cinzenta (RIET-CORREA et al., 1993). No fígado também pode ser observado presença de colágeno, principalmente nos espaços porta e centro lobular (TOKARNIA & DOBEREINER, 1984).

BULL et al., (1968) & PERSON, (1993) caracterizaram os achados histopatológicos, fibrose hepática, hiperplasia de ductos biliares e megalocitose como patognomônico em animais intoxicados pelos alcalóides pirrolizidínicos.

2.4 Métodos diagnósticos

2.4.1 Biópsia hepática

Segundo BETTY & MARKSON, (1954), os exames histopatológicos realizados através de biópsia hepática são úteis para o diagnóstico de intoxicação

por *Senecio sp* ou qualquer outra entidade que determine alterações morfológicas difusas no parênquima hepático.

A técnica mais utilizada para a realização de biópsias hepáticas em bovinos foi descrita por BRAGA et al., (1985). Esta técnica é de fácil execução e permite sua utilização a nível de campo. Para tanto se utiliza agulha de Menghini e os fragmentos hepáticos são coletados através de punção transtorácica entre o 10º e 11º espaço intercostal, direcionando-se a agulha de maneira cranio-ventral tendo como referência a articulação escápulo-umeral do lado oposto a punção. Os fragmentos são recuperados e fixados em formol a 10%.

Nas intoxicações pelos alcalóides pirrolizidínicos ocorrem lesões histopatológicas patognomônicas que caracterizam a doença na presença de megalocitose, hiperplasia de ductos biliares e fibrose hepática (BULL et al., 1968; PERSON, 1993). Com esta afirmação o uso da biópsia hepática pode ser considerado o melhor meio diagnóstico para identificar animais doentes dentro de um rebanho.

2.4.2 Análises clínicas

Poucos métodos foram descritos para a realização do diagnóstico de seneciose por testes diagnósticos. É difícil prever a quantidade de toxinas que o animal foi exposto e se esta exposição resultou em lesão hepática e, qual teste diagnóstico pode ser usado para propor um prognóstico (MEYER et al., 1995).

A atividade sérica de enzimas de origem hepática como gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e concentrações séricas de bilirrubina são

adotadas para o diagnóstico de alterações hepáticas em seres humanos e animais domésticos (Bonel-Raposo, et al., 2004). A natureza da patologia hepática, se necrótica ou colestática, pode ser determinada pela análise simultânea da atividade sérica das enzimas ALT e GGT, porém ruminantes apresentam pouca atividade hepática de ALT. A AST só pode ser utilizada para avaliar o grau de necrose hepática se não ocorrerem simultaneamente outras doenças não hepáticas. A avaliação da GGT e FA que tem grande vantagem para o diagnóstico de colestase em ruminantes, por ser uma enzima originária do tecido biliar hepático, aumenta sua atividade nos casos de colestase intra e extra-hepática e dano de ductos biliares (KANEKO, et al., 1997).

LISTON et al., (2004) relatam que rebanhos onde já foi confirmado o diagnóstico da intoxicação por *Senecio sp* através de análises histopatológicas, os valores de GGT podem ser utilizados nos demais animais do rebanho como forma de diagnóstico/prognóstico. Animais com valores de GGT superiores a 30 UI/L podem receber prognóstico produtivo desfavorável.

2.5 Toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos

Todas as partes da planta são consideradas tóxicas, mesmo depois de dessecadas (DRIEMEIER & BARROS, 1992). A planta é pouco palatável aos bovinos, e eles normalmente evitam sua ingestão (BULL, 1961), porém há indícios que alguns animais desenvolvem o vício da ingestão de *Senecio sp* (HARPER & WOOD, 1990).

A toxicidade destas plantas se deve à presença dos alcalóides pirrolizidínicos (McLEAN, 1970). PEARSON, (1993) descreveu o mecanismo de

ação dos alcalóides pirrolizidínicos relatando que, depois da absorção, a circulação portal transporta os alcalóides até o fígado onde são metabolizados pelas enzimas microssômicas dos hepatócitos, até pirróis mais tóxicos. Os pirróis podem promover um elo cruzado do DNA de cadeia dupla, podendo desta forma promover um efeito antimitótico. No hepatócitos ocorre expansão do citoplasma sem haver divisão nuclear transformam a célula hepática em megalócitos. À medida que as células morrem são substituídas por tecido conjuntivo fibroso e o fígado gradualmente começa a se mostrar insuficiente. A doença pode ser de caráter agudo, crônico e também acarretar alterações mutagênicas em varias espécies animais.

Estudos *in vitro* utilizando *Salmonella typhimurium* TA100, FU et al., (2002), provaram a capacidade mutagênicas dos alcalóides pirrolizidínicos assim como seus efeitos teratogênicos foram estudados em camundongos.

Os processos metabólicos dos alcalóides pirrolizidínicos após sua ingestão têm sido estudados *in vitro* e *in vivo*. FU et al., (2002) citam três principais vias do processo metabólico destas substâncias.

1. Hidrólise de grupos esteres para formar bases necinas (incluindo as bases heliotricina, retronecina e otonecina).
2. Oxidação das bases necinas para formar o correspondente *N*-óxido necina.
3. Hidroxilação das posições C-3 ou C-8 das bases necinas para formar os derivados 3- ou 8-hidroxinecina seguido pôr uma desidratação formando um derivado pirrol dehidropirrolizidina de toxicidade comprovada.

Estas três vias metabólicas são responsáveis pela produção dos metabólitos ativos e tóxicos aos animais. Como esperado, muitos destes

processos ocorrem a nível hepático. A hidrólise de grupos esteres para formar bases necinas é uma via de detoxificação dos alcalóides pirrolizidínicos catalisada pela enzima carboxiesterase. *N*-óxido necina é catalisada pelas enzimas do citocromo P-450 e pelas flavina monooxigenases. A dehidropirrolizidina é catalisada pelas enzimas do citocromo P-450 (MATTOCKS, 1986).

Indóis e terpenos são compostos voláteis presentes em plantas do género *Senecio sp* consideradas tóxicas aos animais (ROMERO et al., 2002). Os terpenos são responsáveis pela congestão e edema da mucosa gastrointestinal, alterando sua capacidade de absorção, também podemos observar degeneração hidrópica e gordurosa e necrose centrolobular no fígado devido a ação deste composto (ZEINSTEGER et al., 2003). Os sesquiterpenos combinados com ácidos aromáticos de vegetais provocam um aumento da permeabilidade da membrana a cátions divalentes (ABRAMOV et al., 2001). O acumulo destes no interior da célula leva a um aumento isoosmótico de água e conseqüente tumefação celular que pode explicar o edema tecidual (COTRAN et al., 2000). Estudos histopatológicos revelam que a administração oral de terpenos a ratos produziu alterações no fígado e sistema gastrointestinal (PAUMGARTTEN et al., 1990). ROMERO et al., (2002) demonstraram que a administração destes compostos voláteis a ratos ocasionou ação tóxica sobre o fígado e uma provável potencialização dos efeitos tóxicos dos alcalóides pirrolizidínicos.

Reações químicas como a peroxidação lipídica que ocorrem durante o metabolismo dos alcalóides pirrolizidínicos podem levar a formação de processos tumorais. A peroxidação lipídica é responsável pelas alterações que ocorrem no DNA das células. O metabólito trans 4-hidroxi-2-hexenel pode ser produzido por

duas vias: uma, através de clivagens enzimáticas e a outra pela indução da peroxidação lipídica. A substância trans 4-hidroxi-2-hexenal possui alta toxicidade e outros aldeídos α , β -Insaturados (malondialdeído) são carcinogênicos e mutagênicos (FU et al., 2002).

Em humanos, doenças crônicas envolvendo o fígado tem sido relacionadas com estresse oxidativo (ROBERTSON et al., 2001).

VIDELA et al., (2004), associam o dano hepático crônico com a diminuição dos níveis de glutathiona (GSH) que pré dispõe a ação dos radicais livres sobre as células causando danos oxidativos irreversíveis.

3 Radicais livres

Radicais livres são qualquer espécie química de existência independente que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Esta configuração eletroquímica muito instável confere a estas estruturas alta reatividade e vida curta. Uma vez formados os radicais livres interagem com outras moléculas através de reações de oxiredução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica. A classificação dos radicais livres se dá pelo grupo funcional presente em sua molécula, porém os processos aeróbicos que envolvem o oxigênio são os mais comuns e seus produtos são denominados de espécies reativas do oxigênio (EROs) (CHIHUAILAF et al., 2002). Na mitocôndria o oxigênio consumido é reduzido à água catalizado pela enzima citocromo oxidase. Aproximadamente, 2% a 5% do oxigênio consumido pelos organismos gera normalmente EROs nestas

organelas com a formação do íon superóxido e de peróxido de hidrogênio (PARKER, 2002).

Segundo MOLINA (2003), as principais espécies reativas do oxigênio são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) sendo que a principal fonte produtora destas EROs é a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons.

O metabolismo de vários compostos endógenos e exógenos assim como doenças virais que acometem o fígado podem estar envolvidas na produção de EROs (BULJEVAC, et al., 1996; CLOT, et al., 1994). As EROs possuem a habilidade de reagir rapidamente com varias moléculas orgânicas danificando-as e desta forma interferindo no função celular (INOUE, 1994). As células são equipadas com um sistema de proteção antioxidante, enzimático e não enzimático, que tem a importante função de inibir os efeitos deletérios das EROs (CHIHUAILAF et al., 2002).

Pacientes com comprometimento das funções hepáticas são pré dispostos a sofrer lesões oxidativas decorrentes do excesso de radicais livres. Isto ocorre pela diminuição da proteção antioxidante principalmente pela depleção da glutatona (CZUCZEJKO et al., 2003).

3.1 Radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem

sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O_2^\bullet (seja enzimático, fagocítico ou químico) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Em pacientes humanos há uma relação entre cirrose hepática descompensada e um aumento do ânion de O_2^\bullet provavelmente produzido pelos leucócitos, este radical está envolvido nos processos de peroxidação de lipídios de membrana que ocasionam dano hepático (CHEN et al., 1997).

3.2 Radical hidroxila (OH^\bullet)

É considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^\bullet com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o OH^\bullet for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado a um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o OH^\bullet pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupamentos sulfidrílicos (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A administração de substâncias antioxidantes, principalmente “scavengers” de radicais OH^\bullet , a pacientes com doença hepática pode prevenir o desenvolvimento da cirrose provavelmente por estas alterações estarem associadas ao estresse oxidativo (BRUCK et al., 2001).

3.3 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H₂O₂ é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH[•] (reação de Fenton). O H₂O₂ tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro. Assim, é altamente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

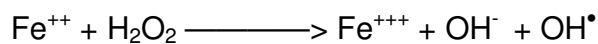
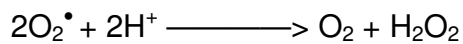
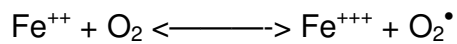
SZUSTER-CIESIELSKA et al., (2002), estudaram a capacidade dos neutrófilos circulantes de produzir H₂O₂ em pacientes humanos com cirrose hepática. Os resultados demonstram que em pacientes cirróticos houve um aumento significativo na geração de H₂O₂ tanto em pacientes com cirrose hepática compensada como naqueles indivíduos descompensados, podendo desta forma, ser o H₂O₂ responsável pelas lesões que ocasionam a degeneração dos hepatócitos.

3.4 Produção de espécies reativas de oxigênio favorecidas pelos íons ferro e cobre

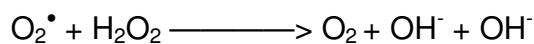
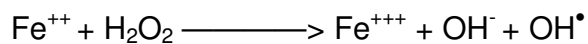
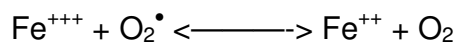
O papel dos metais na formação *in vitro* das EROs é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber – Weiss. Embora o cobre possa catalizar a reação de Haber – Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalizar as reações de oxidação de biomoléculas. Como pode ser observado a seguir, nas reações de Fenton e Haber

– Weiss onde são formadas diferentes tipos de EROs (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Reação de Fenton:



Reação de Haber – Weiss:



O ferro e o cobre são transportados, utilizados e estocados ligados a proteínas específicas (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), as quais previnem ou minimizam as reações de oxidação catalisadas por estes metais. Existem evidências de que no citossol das células hepáticas há “ferro livre” ou “ferro lábil” (não ligado à ferritina), definido como aquele ligado fracamente a compostos de baixo peso molecular. Este ferro é facilmente dissociado na forma de íon, tornando-se cataliticamente ativo e apto a participar das reações de produção de EROs através da reação de Fenton. Os produtos desta reação são prejudiciais as células, inclusive às proteínas reguladoras e/ou limitadoras da captação do ferro extracelular. Nos eritrócitos, esta liberação é acompanhada pela formação de metahemoglobina, principalmente quando os mesmos estão depletados de glutatona reduzida. A liberação do Fe^{++} é acompanhada pela peroxidação lipídica

da membrana e como consequência ocorre hemólise (KOURY & DONANGELO, 2003).

4 Mecanismos de ação dos radicais livres

Os radicais livres exercem um papel importante nos processos homeostáticos como intermediários de reações de oxidação-redução (redox) essenciais para a vida. A destruição de microorganismos pela fagocitose, síntese de mediadores da inflamação, e processos de detoxificação de substâncias são exemplos da importância dos radicais livres, porém, quando em excesso podem causar alterações em estruturas biológicas alterando o metabolismo celular. A ação maléfica dos radicais livres nas células ocorre devido a peroxidação que eles exercem sobre estruturas lipídicas e protéicas. A peroxidação lipídica inicia quando as EROs atacam ligações duplas ou triplas de ácidos graxo poliinsaturado alterando sua conformação química inicial, estas reações após iniciarem se auto perpetuam. Como consequências têm alterações na coesão, fluidez, permeabilidade e funções metabólicas das células (CHIHUAILAF et al., 2002).

Os aminoácidos, peptídeos e proteína também são alvos das EROs, porém sua ação sobre estas estruturas são menores quando comparadas com os lipídeos pois estas reações ocorrem de forma mais lenta (CHEESEMAN & SLATER, 1993; MORRISEY & O'BRIEM, 1998). Tem-se observado que a presença de grandes quantidades de aminoácidos aromáticos sulfurados torna a célula mais vulnerável a ação das EROs (MORRISEY & O'BRIEM, 1998). Estudos realizados *in vitro* afirmam que as proteínas sofrem alterações nos sítios onde há ligações com metais de transição. Estes sítios são particularmente susceptíveis

devido a facilidade com que os metais de transição se ligam com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para formar OH^\bullet que reage com os aminoácidos adjacentes (CHEESEMAN & SLATER, 1993). O DNA também é alvo da ação das EROs (MACHLIN & BENDICH, 1987; BANDYOPADHYAY et al., 1999). As alterações estruturais nas cadeias de DNA ocorrem pela oxidação da desoxirribose, ruptura e entre cruzamento de cadeias e alterações nas bases nitrogenadas. Em animais intoxicados pelos alcaloides pirrolizidínicos ocorrem formações tumorais e alterações gênicas devido ao estresse oxidativo produzido durante o metabolismo hepático destas substâncias (FU et al., 2002).

Os organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante para proteger as células dos efeitos indesejáveis dos radicais livres, sistema enzimático e não enzimático, cuja função é limitar a produção e capturar os EROs que estão presentes e também remover e reparar os danos ocasionados pelos mesmos (YU, 1994).

4.1 Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é tido como um desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos. Quando este desequilíbrio ocorre, é produzida uma série de substâncias pró-oxidantes, acima da capacidade antioxidante do organismo. Isso pode acontecer pela superprodução de pró-oxidantes e/ou pela deficiência no sistema antioxidante (BAYNES, 1991; PARTHIBAN et al., 1995). O fígado é um importante sítio de produção e armazenamento de substâncias antioxidantes, entre elas a glutatona.

Alterações hepáticas que levem a uma diminuição da produção ou exaustão da glutathiona promovem um aumento da peroxidação lipídica e conseqüentemente dano ao tecido hepático (NICOLA, 1996; VENDEMIALE, 2001; CZUCZEJKO et al., 2003).

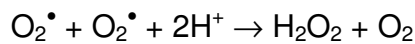
5 Mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos

Define-se como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato Halliwell & Gutteridge (1999). Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática. Assim, as EROs e outras espécies reativas são constantemente inativadas através de diferentes mecanismos, de forma a impedir reações posteriores de propagação.

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSHpx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical OH^{\bullet} (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

5.1 Superoxido dismutase

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos é específica na remoção do radical O_2^{\bullet} , catalisa a dismutação do radical O_2^{\bullet} em H_2O_2 através da seguinte reação:



O H_2O_2 por sua vez é degradado pela ação da catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GSH_{Px}), resultando em água (H_2O) e oxigênio (O_2). As SOD que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD) estão presentes em quase todas as células eucarióticas. Nas células animais, a maior quantidade de CuZn-SOD está no citosol, mas pode estar presente nos peroxissomas, lisossomas, núcleo e no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria. A SOD que contém manganês no seu sítio ativo (Mn-SOD) é encontrada em bactérias, plantas e animais. Na maioria dos tecidos animais este tipo de SOD está localizado na mitocôndria. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

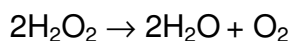
NADKARNI & D'SUOZA (1988), utilizaram ratos com cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono como modelo experimental para estudar alterações nas enzimas antioxidantes. Neste estudo foi demonstrado que animais cirróticos apresentaram diminuição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, sugerindo que a diminuição das defesas antioxidantes aumenta os níveis de EROs sendo responsáveis pelos danos ocasionados aos hepatócitos.

5.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT) está localizada em grande quantidade nos peroxissomas. Uma pequena concentração de CAT pode ser encontrada, também, na mitocôndria (fígado), nos cloroplastos e no retículo endoplasmático (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O peróxido de hidrogênio é removido geralmente pela ação da CAT que reage com duas moléculas de H_2O_2 formando duas moléculas de H_2O e uma de O_2 (NORDEBERG & ARNER, 2001).

Reação catalisada pela CAT:



5.3 Glutathiona peroxidase

A família das glutathionas peroxidases (GSH_{Px}) removem H_2O_2 acoplando sua redução à água com a oxidação da glutathiona reduzida (GS). Também as enzimas GSH_{Px} podem agir sobre outros peróxidos além do H_2O_2 . Elas contêm selênio (Se) no sítio ativo e são vastamente distribuídas nos tecidos animais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo um grupo tiol e é substrato para a GSH_{Px} . A glutathiona oxidada (GSSG), resultante da reação catalisada pela GSH_{Px} , é reduzida a GS pela enzima glutathiona redutase (GRd) que utiliza NADPH para catalisar a reação.

Além da sua função como cofator para a família de GSH_{Px} , a glutathiona está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo

do ácido ascórbico, comunicação entre células e, prevenção da oxidação de grupos -SH de proteínas evitando pontes intercadeias. Em adição, a GSH pode quelar íons cobre e diminuir sua habilidade para gerarem radicais livres. A maior parte da glutatona livre intracelular *in vivo* está na forma reduzida (GS) e não na forma oxidada (GSSG). Contudo, uma parte pode ser encontrada como dissulfetos mistos com outros compostos que contêm grupos-SH. Os grupos tióis nas proteínas são freqüentemente essenciais para a sua estabilidade e/ou função. Além disso, os grupos tióis de proteínas podem reagir com GSSG e formar dissulfetos mistos, processo denominado S-tiologia de proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os achados de CZUCZEJKO et al., (2003) sugerem que as doenças hepáticas crônicas podem ser causadas pelos danos peroxidativos que ocorrem nas membranas celulares, isto se deve a diminuição das enzimas antioxidantes, principalmente pela depleção da GSH nas células.

LOGUERCIO et al., (2001), encontraram diminuição de compostos antioxidantes como Zn, Se e GSH no plasma e Se e GSH nos eritrócitos de humanos com doença hepática crônica. Os dados deste estudo indicam que a cirrose induz uma diminuição da GSH e conseqüentemente leva ao estresse oxidativo.

6 Mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos

Outros agentes antioxidantes que agem na defesa celular contra os radicais livres são compostos hidrofílicos (vitamina C, catecois) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina A e vitamina E). Entre estas, a vitamina E e C possuem maior

importância. A vitamina C (ácido ascórbico) tem ação “scavengers” e também regeneradora de vitamina E (α -tocoferol). A vitamina C como é hidrosolúvel possui ação maior no plasma sangüíneo enquanto que a vitamina E tem ação maior em membranas celulares, por ser lipossolúvel (WEFER & SIES, 1988; SIES & MURPHY, 1991).

MAIO et al., (2000) estudaram as implicações sobre o metabolismo de micronutrientes em pacientes humanos com cirrose hepática devido ao alcoolismo. Nestes pacientes a doença hepática pode levar a uma diminuição no armazenamento ou alterações nos mecanismos de conversão das vitaminas nas suas formas ativas. Os pacientes cirróticos apresentam deficiência de vitaminas A, E e C, principalmente na doença crônica, o que favorece o estresse oxidativo com peroxidação das membranas dos eritrócitos, provocando anemia, e dos hepatócitos, perpetuando a doença hepática.

7 Objetivos

Considerando que diversos estudos comprovam o efeito nocivo dos alcalóides pirrolizidínicos no tecido hepático o presente trabalho objetivou avaliar o estresse oxidativo nos eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp* através da:

- Peroxidação lipídica,
- Fragilidade osmótica,
- Quantificação dos níveis de NPSH e atividade da enzima SOD
- Predisposição à fragilidade osmótica.

8 Artigo científico

Estresse oxidativo em eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp.*

Oxidative stress in the erythrocytes of cattle intoxicated with *Senecio sp.*

Carlos Bondan, Julio Cesar Mendes Soares, Marcelo da Silva Cecim, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dominguita Lühers Graça, Ricardo Xavier da Rocha

Resumo

Intoxicação causada por *Senecio sp* é caracterizada por danos irreversíveis às células hepáticas e pode estar associada com estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da intoxicação por *Senecio sp* sobre a peroxidação lipídica, defesa antioxidante e resistência osmótica dos eritrócitos em bovinos. Amostras sanguíneas de 30 animais intoxicados (grupo 1) e 30 animais sadios (grupo 2) foram analisadas. O diagnóstico de intoxicação por *Senecio sp* foi baseado nas lesões histopatológicas verificadas através de biópsia hepática. Os seguintes parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo nos eritrócitos foram determinados: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da enzima cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) e grupamentos Tióis não-proteicos (NPSH). A fragilidade osmótica dos eritrócitos também foi avaliada. Os níveis de TBARS e atividade da CuZnSOD foi significativamente maior ($p < .001$) no grupo 1 quando comparado ao o grupo 2. A concentração de NPSH nos eritrócitos foi significativamente menor ($p < .03$) no grupo 1 quando comparado ao grupo 2. A

fragilidade osmótica foi maior nos eritrócitos do grupo 1 quando comparada ao grupo 2 ($p < .001$). O resultado deste estudo indica que a intoxicação por *Senecio sp* causa um aumento na peroxidação lipídica, oxidação de NPSH, e conseqüentemente estresse oxidativo nos eritrócitos, o qual pode contribuir para a hemólise. Estes achados podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no dano celular em animais intoxicados por *Senecio sp*.

Palavras-chave: Bovinos, hemólise, peroxidação lipídica, grupos sulfidris não protéicos, estresse oxidativo, células vermelhas do sangue, *Senecio sp*, superóxido dismutase.

ABSTRACT

Intoxication caused by *Senecio sp* is characterized by irreversible damage to liver cells and may be associated with oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the effects of intoxication by *Senecio sp* on lipoperoxidation, antioxidant defenses, and the osmotic resistance of erythrocytes in cattle. Blood samples from 30 intoxicated animals (group 1) and 30 samples from healthy animals (group 2) were analyzed. The diagnosis of poisoning by *Senecio sp* was based on histopathologic lesions verified through hepatic biopsy. The following biochemical parameters of oxidative stress in the erythrocytes were determined: thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) activity, and nonprotein sulfhydryl (NPSH) groups. Erythrocyte osmotic fragility also was evaluated. TBARS concentration and CuZnSOD activity were significantly ($P < .001$) higher in group 1 when compared with group 2. The concentration of erythrocyte NPSH groups was significantly ($P < .03$) lower in group 1 when

compared with group 2. Osmotic fragility was more pronounced in the erythrocytes of group 1 when compared with group 2 ($P < .001$). The results of this study indicate that poisoning by *Senecio sp* causes a increase in lipoperoxidation, oxidation of NPSH groups, and consequently, oxidative stress in bovine erythrocytes that may contribute to hemolysis. These findings may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in cell damage in animals intoxicated by *Senecio sp*.

Key Words: Bovine, hemolysis, lipid peroxidation, nonprotein sulfhydryl, oxidative stress, red blood cell, *Senecio sp*, superoxide dismutase.

Introdução

Na região sul do Brasil, 50% das mortes por plantas tóxicas são causadas pelo *Senecio sp*, que levam a grandes perdas econômicas.¹ A intoxicação causada por *Senecio sp* é caracterizada por danos irreversíveis as células hepáticas pela ação dos alcalóides pirrolizidínicos (APs) e substâncias voláteis como indóis e terpenos, que estão presentes nestas plantas.^{3,4} Os APs reagem com macromoléculas nas células em que elas são formadas ou acarretam alterações nas ligações S-S das proteínas e entre cruzamento nas cadeias do DNA. Os APs demonstram ter atividade mutagênica e o alvo dos metabólitos secundários são áreas específicas do DNA.⁵ Carcinogênicos químicos como os APs encontrados no *Senecio* podem exercer efeitos tumorgênicos através de mecanismos secundários, assim como estresse oxidativo, indução da peroxidação lipídica, alterações no DNA, indução da proliferação de peroxissômos e modulação de alterações endócrinas.⁶ Alterações histopatológicas causadas pelo *Senecio* são caracterizadas por fibrose hepática, hiperplasia biliar,

hepatomegalocitose e colestase.^{2,7,8} Têm sido demonstrado que os APs presentes no *Senecio sp* podem ocasionar alterações na membrana celular.^{3,4}

A intoxicação por *Senecio sp* em ovelhas está relacionada com crises hemolíticas secundárias⁹ em resposta à maciça deposição de cobre na corrente sanguínea que causa dano hepático crônico.¹⁰ O cobre é um metal pró-oxidante,¹¹ sua maciça liberação pode estar associado com estresse oxidativo e possivelmente uma predisposição à hemólise. Entretanto, não há dados na literatura que comprovam a ação do cobre neste tipo de intoxicação em bovinos.

Os eritrócitos são constantemente expostos às espécies reativas de oxigênio (ERO) devido a sua função de transportar oxigênio via hemoglobina.¹²⁻¹⁴ A oxidação dos eritrócitos tem sido extensivamente estudada como um modelo de dano oxidativo das biomembranas, e isto tem demonstrado que os ERO atacam as membranas dos eritrócitos para induzir a oxidação de lipídios e proteínas, eventualmente causando hemólise.^{15,16}

Estudos anteriores tem descrito um aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos em modelo experimentais de estresse oxidativo.^{15,17,18} O dano ao sistema antioxidante ou o aumento da produção de ERO é responsável por alterações na estrutura celular dos eritrócitos.¹⁴ Sabe-se que um desequilíbrio no “*status*” oxidante-antioxidante das células está associado com estresse oxidativo, e isto causa uma cascata de eventos dentro da célula como a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas,^{14,19} que pode ser a causa da hemólise e anemia.

O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre estresse oxidativo em eritrócitos de bovinos, a resposta antioxidante e o efeito deletério da intoxicação por *Senecio sp* na suscetibilidade a hemólise.

Materiais e métodos

Animais

Sessenta novilhas de corte Red Angus com idades entre 18 e 24 meses foram divididas em dois grupos: grupo 1 (grupo intoxicado) e grupo 2 (grupo controle). O grupo 1 pastou em piquetes com alta infestação de *Senecio sp* e o grupo 2 foi mantido em piquete livre da referida planta. Os animais foram mantidos nos locais por aproximadamente sete meses (de junho de 2003 a janeiro de 2004). Os animais pertenciam a uma fazenda privada de criação de bovinos e foram consultados por um veterinário local, depois do diagnóstico os bovinos foram enviados para o frigorífico. Todos os procedimentos usados foram aprovados pelo Comitê Universitário de ética para o uso de animais em ensino e pesquisa. O diagnóstico de intoxicação por *Senecio sp* foi baseado nos achados histopatológicos (fibrose, hiperplasia de ductos biliares e hepatomegalocitose) verificadas através de biópsia hepática. Amostras de fígado foram coletadas no mesmo dia em que foram feitas as coletas de sangue (ver abaixo). A biópsia de tecido hepático foi realizada usando-se o método descrito por Braga et al.¹⁵ Os fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol a 10% e encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, Brasil), onde foram processados em lamina de parafina e corados com H&E.

Colheita de amostras sanguíneas

As amostras de sangue foram obtidas dos 30 animais intoxicados (grupo 1) e dos 30 animais sadios (grupo 2). Dez mililitros da amostra foram coletados da veia

jugular e processados dentro de 1 hora após a coleta. Cinco mililitros de sangue foram transferidos para tubos estéreis de polipropileno contendo heparina para determinação da fragilidade osmótica dos eritrócitos e para determinação bioquímica nos eritrócitos, incluindo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) e a concentração dos NPSH. Para o hemograma, 2,5 mL de sangue foram transferidos para tubos estéreis de polipropileno contendo EDTA, o restante 2,5 mL foram transferidos para tubos estéreis de polipropileno para as análises bioquímicas e cobre sérico.

Hemograma e Análise Bioquímica

Os eritrócitos foram contados usando-se um hemocítômetro com exclusão das amostras de sangue hemolisadas. Os leucócitos foram determinados por contagem manual. O hematócrito (Ht) foi mensurado usando-se o método de centrifugação, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina circular média (HCM) foram calculados. Para as análises bioquímicas da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) foi utilizado o aparelho Bio Plus – Bio 200 FL CELM (São Paulo, SP, Brasil), e os resultados foram expressos em U/L. Hemoglobina e proteína plasmática total foram quantificadas com *kits* comerciais usando métodos colorimétricos (Labtes, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os níveis de albumina foram determinados pelo método do verde de bromocresol e as globulinas pela subtração da albumina presente nas proteínas totais.

Parâmetros Bioquímicos de Estresse oxidativo

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. TBARS foram determinados nos eritrócitos de acordo com o método descrito por Ohkawa et al.²¹ As amostras sanguíneas foram centrifugadas por 10 min a 1000 g e os eritrócitos foram lavados três vezes com NaCl 0,9%. Em seguida, os eritrócitos foram diluídos em NaCl 0,9% obtendo-se um hematócrito de 50% (1:1). A quantidade de TBARS produzida foi mensurada por espectrofotocolorimetria em absorvância de 532 nm, usando malondialdeído (MDA) para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em pmol MDA/g de hemoglobina. A hemoglobina foi determinada através de método colorimétrico utilizando-se *kit* comercial (Labtest).

Atividade da CuZnSOD. A atividade da CuZnSOD nos eritrócitos foi baseado na capacidade da enzima em inibir a auto-oxidação da epinefrina em pH alcalino. As amostras sanguíneas foram centrifugadas por 10 minutos a 1000g e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com NaCl 0.9%. A atividade intracelular da CuZnSOD nos eritrócitos lisados foi determinada através de um método cinético. A reação foi mensurada em 480 nm, de acordo com o método descrito por Sun & Zigman.²² Os resultados foram expressos em UI/g hemoglobina.

Grupamentos Tióis não-proteicos. A concentração de NPSH nos eritrócitos foi determinada usando reagente de Ellman, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB). Após a precipitação das amostras sanguíneas com TCA a 20%, as amostras foram centrifugadas a 2000g por 10 min, para quantificação de NPSH no sobrenadante. A concentração foi calculada em $\mu\text{mol SH/L}$ nos eritrócitos usando

glutathiona reduzida (GSH) para construção da curva padrão segundo o método descrito por Ellman.²³

Determinação dos níveis de cobre nos eritrócitos. Para as análise da concentração de cobre (expressos em mg/L) utilizou-se espectrofotometria de absorção atômica (Espectrofotômetro-GBC 932 AA, Austrália) de acordo com o método descrito por Terrés-Martos et al.²⁴

Teste de fragilidade osmótica

O teste da fragilidade osmótica nos eritrócitos é baseado na mensuração da resistência das células à hemólise em soluções hipotônicas de NaCl. Após a coleta do sangue heparinizado, os eritrócitos foram lavados duas vezes com NaCl 0,9%. Os eritrócitos foram diluídos em NaCl 0,9% e o hematócrito ajustado a 50% (1:1). Uma alíquota desta suspensão foi adicionada em tubos contendo uma solução de NaCl (100, 50 e 0 mmol/L) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Depois de incubados, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500g e a hemoglobina foi determinada no sobrenadante usando *kit* comercial (Labtest, Belo Horizonte, MG, Brasil). A hemólise em cada amostra foi expressa em porcentagem, considerando como 100% o valor máximo da absorbância em água destilada (concentração de NaCl 0%).

Análise Estatística

Os resultados são expressos em média \pm SD. Os resultados foram avaliados pelo teste-t de Student e determinação do coeficiente de correlação de Pearson. (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL, USA). Diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados

Os bovinos intoxicados por *Senecio* apresentavam danos nos hepatócitos diagnosticados através da histopatologia, que demonstrou fibrose, hiperplasia de ductos biliares, hepatomegalocitose, e variados graus de colestase (figura 1). Os resultados das análises hematológicas e bioquímicas não apresentaram diferenças estatística significativas entre os grupos 1 e 2 (tabela 1). A atividade das enzimas AST e GGT no soro foi significativamente maior no grupo 1 quando comparadas ao grupo 2.

Os bovinos do grupo 1 tiveram um aumento significativo nos níveis de TBARS quando comparado com aqueles do grupo 2 ($P < .001$) (tabela 1). A concentração de NPSH nos eritrócitos do grupo 1 foi significativamente menor quando comparada ao grupo 2 ($P < .03$). Ocorreu um aumento significativo na atividade da enzima CuZnSOD no grupo 1 quando comparado com o grupo 2 ($P < .001$). Nenhuma diferença estatística foi observada nos níveis séricos de cobre entre os grupos 1 e 2.

No teste de fragilidade osmótica, ocorreu um aumento na percentagem de hemólise no grupo 1 quando comparado ao grupo 2 ($P < .001$) na concentração de

100 mmol/L de NaCl. Nenhuma diferença foi observada nas concentrações de 50 ou 0 mmol/L de NaCl (dados não demonstrados). Uma correlação negativa foi encontrada entre a concentração de NPSH e a porcentagem de hemólise dos eritrócitos de bovinos do grupo 1 ($r = -0,62$, $P < .002$).

Discussão

O efeito hepatotóxico dos APs presentes em planta de *Senecio sp* já foi descrito e caracterizado por ocasionar danos irreversíveis aos hepatócitos.^{7,8,10,25} Animais intoxicados por *Senecio sp* apresentam um aumento na atividade das enzimas séricas AST e GGT, que indica dano hepatocelular e colestase ou hiperplasia de ductos biliares.²⁶ Os achados histopatológicos no fígado incluem fibrose, hiperplasia de ductos biliares, e hepatomegalocitose característico dos danos hepáticos ocasionados na intoxicação por *Senecio sp*.^{2,27} Nós demonstramos evidência para a ocorrência de estresse oxidativo nos eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp* baseado nos níveis de TBARS e de NPSH, os quais podem estar associados com o aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos. Resultados similares foram observados em ratos com dano hepático como descrito por Trivedi e Rawal.²⁸ O aumento da atividade da enzima CuZnSOD nos eritrócitos do grupo 1 pode ser interpretada como um mecanismo compensatório (aumentado da síntese desta enzima) devido ao aumento da geração do radical do superóxido.

Diversos estudos, tais como aqueles de Trivedi & Rawal,²⁸ Nicola,²⁹ e Vendemiale et al,³⁰ mostram a importância do fígado em manter o *status* redox e que o dano hepático crônico promove a oxidação de NPSH e aumento dos

radicais livres. Isto, conseqüentemente, pode aumentar os níveis de peroxidação lipídica e os danos celulares.

O aumento da peroxidação lipídica é observado pelo aumento no níveis de TBARS e pela diminuição na concentração de NPSH nos eritrócitos que pode refletir em uma possível diminuição na concentração de GSH, um tripeptídeo chave na proteção dos eritrócitos contra os danos oxidativos.^{15,17,31-33} Os metabólitos pirrois produzidos durante o metabolismo dos APs tem sido amplamente estudados e eles são capazes de se ligar a GSH para forma GSH conjugada.⁶

Mais de 90% da GSH presente na circulação sistêmica resulta do influxo hepático deste peptídeo.³⁴ O fígado é um importante sitio de metabolismo de substâncias tóxicas tais como APs, onde radicais livre freqüentemente são gerados. Se o fígado for incapaz de neutralizar os oxidantes gerados, os EROs podem alcançar a corrente sangüínea e danificar os eritrócitos. Os APs são metabolizados em compostos altamente eletrofílicos que podem produzir peroxidação lipídica e outros formas de injúria celular.⁶ Estes metabólitos reativos são conjugados com a GSH no fígado resultando na diminuição da concentração de GSH hepática.³⁵ Há evidências que os metabólitos dos APs atacam os eritrócitos na doença hepática. A concentração de GSH nos eritrócitos de animais intoxicados pelas pirrolizidinas não foi mensurada anteriormente, entretanto, nossos achados demonstram uma diminuição na concentração de NPSH eritrocitário no grupo 1 indicando que a concentração de GSH nos eritrócitos está diminuída em bovinos intoxicados pelos APs. Gradinsk-Vrbanac et al³⁶

demonstraram que o aumento dos níveis de GSH eritrocitário corresponde a uma maior resistência a peroxidação lipídica causada pelo peróxido de hidrogênio.

O cobre é um metal prooxidante que ocasiona a oxidação da hemoglobina através da reação de Haber-Weiss.¹¹ A intoxicação pelo cobre tem sido associado a crises hemolíticas secundárias à maciça liberação de cobre na corrente sanguínea.¹⁰ Neste estudo, entretanto, nós não observamos um aumento significativo nas concentrações de cobre na corrente sanguínea. A vulnerabilidade dos eritrócitos ao choque osmótico está relacionado às propriedades da membrana.³⁷ Assim é razoável supor que o aumento da fragilidade osmótica esteve ligado ao aumento da peroxidação lipídica e não ao aumento das concentrações de cobre. Este fato pode ser explicado pelo aumento significativo nos níveis deTBARS nos eritrócitos e na diminuição da concentração de NPSH, ambos contribuem em para o aumento da peroxidação lipídica nos eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp.*

Nós concluímos que ocorre estresse oxidativo nos eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp.*, e este pode contribuir para a hemólise. Estes resultados podem contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no dano celular causado pelos APs e outros oxidantes.

Referências

1. Méndez MC, Riet-Correa F. *Plantas Tóxicas e Micotoxicoses [Toxic plants and Micotoxicosis]*. Pelotas, Brazil: Editora Universitária; 2000:9–29.
2. Driemeier D, Barros CSL. Intoxicação experimental por *Senecio oxyphyllus* (Compositae) em bovinos [Experimental poisoning in cattle by *Senecio oxyphyllus* (Compositae)]. *Pesqui Vet Bras*. 1992;12:33–42.
3. Romero A, Zeinsteger P, Teibler P, et al. Lesions hepáticas inducidas por componentes voláteis de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones [Hepatic injury induced by volatile components in mice by *Senecio grisebachii* (margarita)]. *Rev Vet*. 2002;13:15–17.
4. Zeinsteger P, Romero A, Teibler P, et al. Toxicity of volatile compounds of *Senecio grisebachii* Baker (margarita) flowers, in mice. *RIA INTA Argentina*. 2003;32:125–136.
5. Mattocks AR. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. London, UK: Academic Press; 1986.
6. Fu PP, Xia Q, Lin G, et al. Genotoxic pyrrolizidine alkaloids—mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Int J Mol Sci*. 2002;3:948–964.
7. Barros CSL, Metzdorf LL, Santos MN, et al. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em ovinos [Experimental poisoning in sheep by *Senecio brasiliensis* (Compositae)]. *Pesqui Vet Bras*. 1989;9:55–67.
8. Gava A, Barros CSL. *Senecio* spp: poisoning of horses in southern Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 1997;17:36–40.

9. Soli NE. Chronic copper poisoning in sheep: a review of the literature. *Nord Vet Med.* 1980;32:75–89.
10. Ilha MRS, Loretto AP, Barros SS, et al. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul [Spontaneous poisoning in sheep by *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) in southern Brazil]. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21:123–138.
11. Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:1069–1073.
12. Jozwik M, Jozwik M, Jozwik M, et al. Antioxidant defense of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin Chim Acta.* 1997;267:129–142.
13. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, et al. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem* 1999;10:159–165.
14. Tiano L, Fedeli D, Santroni AM, et al. Effect of three diaryl tellurides and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutat Res.* 2000;464:269–277.
15. Kondo H, Takahashi M, Niki E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Lett.* 1997;413:236–238.
16. Racek J, Herynková R, Holecek V, et al. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol Res.* 2001;50:383–388.
17. Batna A, Fuchs C, Spiteller G. Lipid peroxidation in presence of ebselen. *Chem Phys Lipids.* 1997;87:149–158.
18. Fernandez AA, Fink NE. Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: a definition by application of a mathematical model. *Clin Chem*

Lab Med 2000;38:433–436.

19. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab.* 2000;26:63–176.
20. Braga MM, Castilhos LML, Santos MN. Biopsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica [Hepatic biopsy in bovine: a new technique proposal]. *Rev Centro de Ciências Rurais, Santa Maria.* 1985;15:79–88.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–358.
22. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 1978;90:81–89.
23. Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–77.
24. Terrés-Martos C, Navarro-Alarcón M, Martín-Lagos F, et al. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ.* 1997;198:97–103.
25. Peterson JE, Culvenor CCJ. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. In: Keeler RF, Tu AT, eds. *Handbook of Natural Toxins: Plant and Fungal Toxins.* Vol.1. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1983:637–671..
26. Craig AM, Pearson EG, Meyer C. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. *Am J Vet Res.* 1991;52:1969–1978
27. Barros CSL, Metzdorf LL, Peixoto PV. Ocorrência de surtos de intoxicação

- por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul [Occurrence of poisoning in cattle by *Senecio* spp. (Compositae) in southern Brazil]. *Pesqui Vet Bras.* 1987;7:101–107.
28. Trivedi N, Rawal UM. Hepatoprotective and toxicological evaluation of *Andrographis paniculata* on severe liver damage. *Indian J Pharmacol.* 2000;32:288–293.
29. Nicola M. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Rad Biol Med.* 1996;21:291–295.
30. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, et al. Increased stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of *N*-acetylcysteine and interferon alfa. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;175:130–139.
31. Saito I, Asano T, Takakura K. Neuroprotective effect of antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1998;42:269–277.
32. Zhao R, Masayasu H, Holmgren A. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:8579–8584.
33. Nakamura Y, Feng Q, Kumagai T, et al. Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. *J Biol Chem.* 2002;277:2687–2694.
34. Bianchi G, Bugianesi E, Ronchi M, et al. Glutathione kinetics in normal man and in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol.* 1997;26:606–613.

35. Huan JY, Miranda CL, Buhler DR. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology Letters*. 1998;99:127-137.
36. Gradinski-Vrbanac B, Stojevic Z, Milinkovic-Tur S, et al. In vitro susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. *Vet Med Czech*. 2002;47:303-308.
37. Brzezinska SE. Erythrocyte osmotic fragility test as the measure of defense against free radicals in rabbits of different age. *Acta Vet Hung*. 2001;49:413-419.

Figura 1. Corte histológico de tecido hepático de uma novilha do grupo 1 demonstrando fibrose, hiperplasia de ductos biliares e megalocitose devido a intoxicação por *Senecio sp.* H&E, objetiva X10.

Tabela 1. Resultados dos testes hematológicos e bioquímicos utilizados para avaliar o estresse oxidativo nos eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp* (grupo 1) comparados com o grupo controle (grupo 2). Os dados são expressos em média \pm SD

Figura 1, Bondan et al.

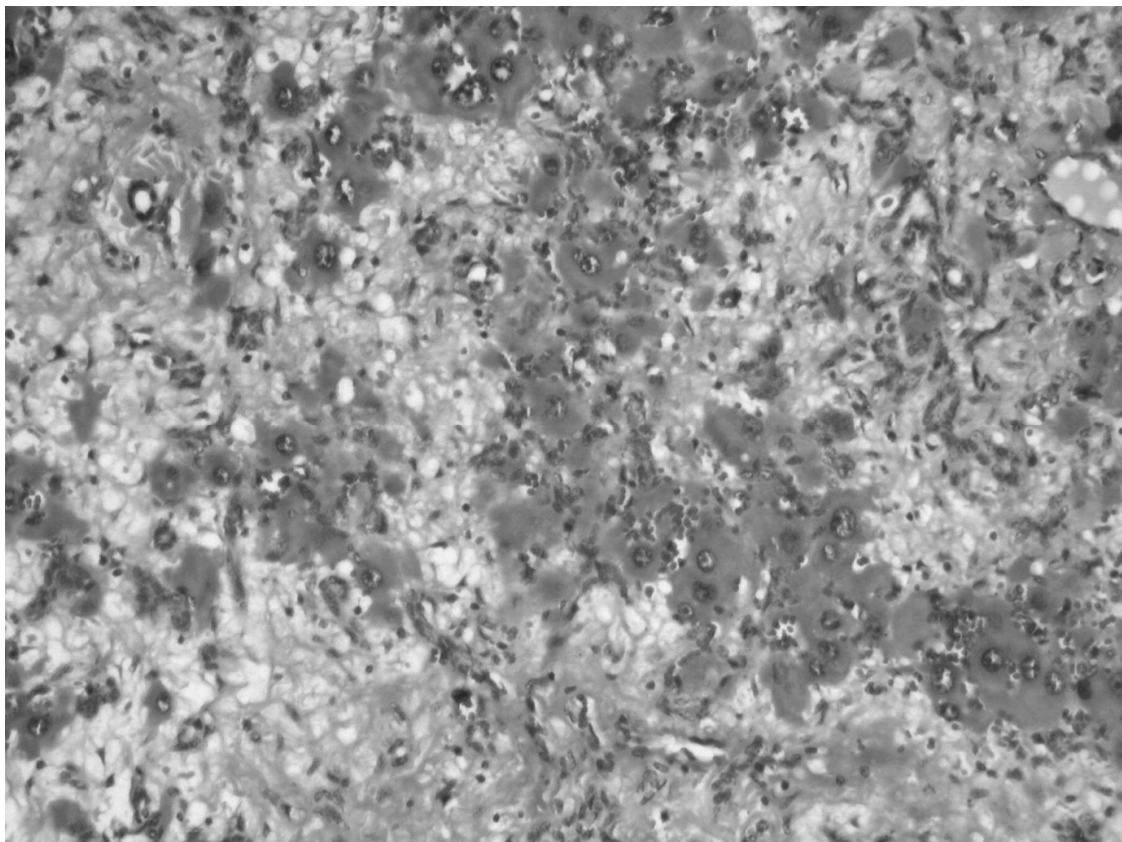


Tabela 1, Bondan et al.

Análises	Grupo 1 (n = 30)	Grupo 2 (n = 30)
Hemograma		
Eritrócitos (X 10 ⁶ células /μL)	6 ± 1	6 ± 1
Hemoglobina (g/dL)	12 ± 1	12 ± 2
HCT (%)	36 ± 6	37 ± 3
VCM (fL)	57 ± 4	56 ± 2
HCM (g/dL)	34 ± 6	34 ± 3
Leucócitos (células/μL)	12,671 ± 784	13,950 ± 779
Análises bioquímicas		
Proteínas (g/dL)	6.7 ± 9.0	7.2 ± 7.0
Albumina (g/L)	2.5 ± 5.0	2.9 ± 8.0
Globulinas (g/dL)	4.2 ± 1.1	4.3 ± 1.1
Aspartato aminotransferase (U/L)	113 ± 29*	82 ± 11*
Gama-glutamil transferase (U/L)	56 ± 32*	31 ± 16*
Estresse oxidativo nos eritrócitos†		
TBARS (pmol MDA/g Hb)	2.4 ± 0.3*	1.6 ± 0.1*
NPSH (μmol/L sangue total)	195 ± 39**	261 ± 27**
CuZnSOD (U/g Hb)	0.33 ± 0.06*	0.23 ± 0.05*
Cobre sérico		
Cobre (mg/L)	0.62 ± 0.08	0.58 ± 0.09
Teste de fragilidade osmótica		
Hemólise em 100 mmol/L NaCl (%)	16 ± 2*	8 ± 1*

* $P < .001$ e ** $P < .03$

† TBARS indica substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; NPSH indica grupamentos sulfidris não protéicos; SOD indica superóxido dismutase.

9 Considerações finais:

Em vista da grande importância que a intoxicação pelas plantas do gênero *Senecio sp* representam para a bovinocultura, vários trabalhos tem sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na geração desta doença. As lesões patológicas tanto macroscópicas como microscópicas já foram vastamente pesquisadas e elucidadas, porem, no que se refere ao metabolismo e biotransformação dos compostos presentes neste gênero de plantas ainda a muito a ser estudado.

O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo ocasionada pela produção de radicais livres durante a biotransformação dos alcalóides pirrolizidínicos e verificar a capacidade hepática quanto a síntese e armazenamento de enzimas antioxidantes.

Os resultados obtidos sugerem que a insuficiência hepática ocasionada pela intoxicação por *Senecio sp* gera estresse oxidativo nos eritrócitos. Isto ocorre em função da produção de radicais livres a parti da biotransformação dos alcalóides pirrolizidínicos e pela diminuição de um importante antioxidante, os grupamentos NPSH.

O aumento da peroxidação lipídica, verificada através do níveis de TBARS, apresentou uma correlação positiva com a fragilidade osmótica nos eritrócitos, comprovando o dano ocasionado a membrana celular.

O organismo animal possui uma ampla linha de defesa para proteger-se da ação dos EROs, neste caso, a enzima antioxidante SOD apresentou níveis elevados na tentativa de compensar o aumento dos EROs, porem, este aumento foi insuficiente para conter a propagação da peroxidação lipídica.

Portanto, conclui-se que a biotransformação dos alcalóides pirrolizidínicos geram EROs. Estes atacam a membrana celular dos eritrócitos causando estresse oxidativo pela incapacidade hepática de manter ou aumentar o *status* antioxidante, e isto, contribui para a hemólise nos eritrócitos.

10 Referências bibliográficas

- ABRAMOV, A.Y.; et al. Influence of plant terpenoids on the permeability of mitochondria an lipid bilayers. **Chem. Toxicol.** v. 51, p. 36, 2001.
- ARAYA, O.; ILLANES, O.; WITTEWER, F. Seneciosis en no-villos después de la exposición natural a la ingestión de *Senecio erraticus*. **Vet. Arg.** v.21, p.62–67. 1986.
- BANDYOPADHYAY, U.; DAS, D.; BANERJEE, R.K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. **Currsci.** v.77, p.658-666. 1999.
- BARROS, C.S.L.; et al.Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio sp.* (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.7, n.4, p.101-107. 1987.
- BAYNES, J. W. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p.405-412, 1991.
- BETTY, R.W. & MARKSON, L.M. Liver biopsy in the diagnosis of ragwort (*Senecio jacobaea*) poisoning in a herd of cattle. **Vet Record**, v.66 n.28, p.398-400, 1954.
- BONEL-RAPOSO, J.; et al. Observações clínicas e bioquímicas em ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por *Myoporum laetum*. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.32, n.1, p.9 – 17, 2004.
- BRAGA, M.M.; CASTILHOS, L.M.L.; SANTOS, M.N. Biopsia hepática em bovinos: Proposta de nova técnica. **Rev. Centro de Ciências Rurais, Santa Maria.** v.15, n.1, p.79-88. 1985.
- BRUCK, R.; et al. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. **J Hepatol.** v.35, n.4, p.457-464, 2001.
- BULJEVAC, M.; et al. Serum selenium concentration in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Acta Med Croatica.** v.50, p.11–14. 1996.
- BULL, L.B. Liver disease in livestock from intake of hepatotoxic substances. **Aust. Vet. J.**, v.37, p.126-130, 1961.
- BULL, L.B.; CULVENOR, C.C.J.; DICK, A.T. The pyrrolyzidine alkaloids. Their chemistry, pathogenicity, and other biological properties. **Amnterdam: North-Holland Publ.** p.293, 1968.
- CARVALHO, G.S.T. & MAUGE, G.C. Ação tóxica do *Senecio brasiliensis* Lessing, família *Compositae*. **Revista Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo.** v.3, n.3, p131-136, 1946.

CARRILLO, B.J.; et al. Intoxicación de bovinos con *Senecio tweediei*. **Med. Vet. Univ. SP.** v.3, p.131–136. 1976.

CHEN, M.F.; et al. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. **Free Radical Biol Med.** v.23, p.672-679, 1997.

CLOT, P.; et al. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. **Gut.** v.35, p.1637–1643. 1994.

CHIHUAULAF, R.H., CONTRERAS, P.A.; WITTWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Vet. Méx.** v.33, n.3, p.265-283. 2002.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. In: CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. editors. **Free Radical in Medicine.** London (UK): 1993.481-493p.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patología Celular I: Lesión y muerte celulares. En: MCGRAW–HILL. **Robbins Patología estructural y funcional**, 6^º ed.,. México, 2000. 4–18p.

CUSHNY, A.R. & WATT, H.E. Senecio poisoning. **Lancet** 1. v.1, p.1089–1090. 1920.

CZUCZEJKO, J.; et al. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. **Acta biochimica Polonica.** v.50, n.4, p.1147-1154. 2003.

DAVIS, C.L. *Senecio* poisoning in cattle. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v.130, p.335–336. 1957.

DRIEMEIER, D. **Intoxicação experimental por *Oxyphyllus* DC (*Compositae*) em bovinos.** Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Universidade Fedear de Santa Maria, Santa Maria, 1990.

DRIEMEIER, D.; BARROS, C.S.L.; PILATTI, C. Seneciose em bovinos. **A hora veterinária.** v.10, n.59, p.23-30, 1991.

DRIEMEIER, D. & BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por *Senecio oxyphyllus* (Compositae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v.12, p.33-42. 1992.

FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil.** v.43, n.1. p.61-8. 1997.

FU, P.P.; et al. Genotoxic Pyrrolizidine Alkaloids — Mechanisms Leading to DNA Adduct Formation and Tumorigenicity. **Int. J. Mol. Sci.** v.3, p.948-964. 2002.

GALLO, G.G. **Plantas tóxicas para el ganado en el Cono Sur de América**, 2^o ed., Hemisferio Sur, Buenos Aires, 1987. 213p.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3th ed Oxford University Press. 1999.

HARPER, J.L. & WOOD, W.A. Biological flora of the British isles (*Senecio jacobaea*). In: DRIEMEIER, D. **Intoxicação experimental por *Oxyphyllus* DC (Compositae) em bovinos**. Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Universidade Fedear de Santa Maria, Santa Maria, 1990.

HOOPER, P.T. Pyrrolizidine alkaloid poisoning-pathology with particular reference to differences in animal and plant species. In: KELLER, R.F.; KAMPEN, V.; JAMES, L.F. **Effect of poisoning plants on livestock**. New York: Academic Press, 1978, p.162-176.

HUAN, J.Y.; et al. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. **Toxicologi Letters**. v.99, p.127-127. 1998.

INOUE, M. Protective mechanism against reactive oxygen species. In: ARIAS, I.M.; BOYER, J.L.; FAUSTO, N. et al. **The liver: biology and pathobiology**. Raven Press Ltd, New York. 1994. p 443–459.

KANEKO, J.J.; HARVEY, D.W.; BRUSS, W.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5^o ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KARAM, F.S.C.; et al., Fenologia de quatro espécies tóxicas de *Senecio* (*Asteraceae*) na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.22, n.1, p.33-39, 2002.

KOURY, J. C. & DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.** v.16, n.4, p. 433-441, 2003.

LISTON, M.A. **Histopatologia, perfil bioquímico e desempenho animal como ferramentas de prognóstico produtivo na intoxicação por *Senecio* sp.** Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

LOGUERCIO, C.; et al. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease. **Biol Trace Elem Res.** v.81,n.3, p.245-254,2001.

MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. Free radical tissues damager: protective role of antioxidant nutrients. **FASEBJ.** p.441-445. 1987.

MAIO, R.; DICHI, J.B.; BURINI, R.C. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. **Arq. Gastroenterol.** v.37, n.2, 2000.

MATTOCKS, A.R. **Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidin Alkaloids.** Academic Press, Orlando, FL. 1986.

MATTOCKS, A.R. & JURKES, R. Improved field tests for toxic pyrrolizidine alkaloids. **J Nat. Prod.** v.50, p.161-166. 1987.

McLEAN, E.K. The toxic action of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Pharm. Ver.** v.22, n.4, p.429-483, 1970.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinário.** Interpretação e diagnóstico. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

MENDÉZ, M.C. Intoxicação por *Senecio sp.* p.43-57 In: RIET-CORREA, F.; MENDÉZ, M.C.; SCHILD, A.L. **Intoxicação por plantas e micotoxinas em animais domésticos.** Pelotas: Editora Hemisfério Sul do Brasil, 1993. 340p.

MOLINA, M.R. El estrés oxidativo y el destino celular. **Revista Química Viva.** v.2, n.1. 2003.

MORRISEY, P.A. & O'BRIEN, N.M. Dietary antioxidants in health and diseases. **Int. Dairy J.** v.8, p.463-472. 1998.

NADKARNI, G.D. & D'SOUZA, N.B. Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. **Biochem Med Metab Biol.** v.40, n.1, p.42-45. 1988.

NICOLA, M. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. **Free Radical Biology & Medicine Oklahoma USA.** v.21, n.3, p.291-295. 1996.

NORDEBERG, J. & ARNÈR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine.** v.31, n.11, p.1287-1312. 2001.

PARTHIBAN, A.; VIJAYALINGAM, S.; SHANMUGASUNDARAM, K. et al. Oxidative stress and the development of diabetic complications – Antioxidantes

and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biol. Int.** v. 19, p. 987-992, 1995.

PAUMGARTTEN, F.J.; et al. Single dose toxicity study of beta-myrcene, a natural analgesic substance. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.23, p.837-847. 1990.

PARKER, L. Antioxidantes y atletismo. Antioxidante y Calidad de vida. Disponível na internet: <http://www.antioxidantes.com.ar/12/art008.htm> Capturada em 16/01/2005.

PEARSON, E.G. Intoxicação por alcaloides da pirrolizidina. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais.** 1ª ed. São Paulo: Manole, v.1, 1993. 852p.

PODESTA, M.; et al. Seneciosis en bovinos, su comprobación en el Uruguay. **Vet.** v.64, p.97-112. 1977.

RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. **Intoxicação por plantas e micotoxinas em animais domésticos.** Editora Hemisfério Sul do Brasil, Pelotas, 340p, 1993.

ROMERO, A.; et al. Lesions hepáticas inducidas por componentes volatiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones. **Rev. Vet.** v.13, p.15-17. 2002.

ROBERTSON, G.R.; LECLER, C.Q.I.; FARRELL, G.C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis: cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v.281, p.1135-1139, 2001.

SIES, H. & MURPHY, M.E. The role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **Photochemistry and Photobiology,** n.8, p.211-224. 1991.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; DANILUK, J.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. **Med Sci Monit.** v.8, n.6, p.419-424, 2002.

TOKARNIA, C.H. & DOBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (*Compositae*) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v.4, n.2, p.39-65, 1984.

VENDEMIALE, G.; et al. Increased Stress in Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in the Rat: Effect of N-Acetylcysteine and Interferon- α . **Toxicology and Applied Pharmacology.** v.175, p.130-139. 2001.

VENZANO, A.J. & VOTTERO, D.A.J. Toxicidad de las especies de *Senecio* en bovinos. **Med. Vet.** v.63, p.426-438, 1982.

VIDELA, L.A.; et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of nonalcoholic fatty liver disease patients. **Clin. Sci.** v.106, p.261–268, 2004.

WALKER, K.H. & KIRKLAND, P.D. *Senecio lautus* toxicity in cattle. **Aust. Vet. J.** v.57, p.1–7. 1981.

WEFERS, H. & SIES, H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. **European Journal of Biochemistry.** n.174, p.353–357. 1988.

WILMONT, F.C. & ROBERTSON, G.W. *Senecio* diseases or cirrhosis of the liver caused by *Senecio* poisoning. **Lancet 1:** p.48–49. 1920.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.** v.74, p.139-162. 1994.

ZEINSTEGER, P.; et al. Toxicity of Volatile Compounds of *Senecio grisebachii* Baker (margarita) Flowers, In Mice. **RIA INTA, Argentina.** v.32, n.2, p.125-136. 2003.

11. Anexo

Oxidative stress in the erythrocytes of cattle intoxicated with *Senecio* sp

Carlos Bondan, Julio Cesar Mendes Soares, Marcelo Cecim, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dominguita Lühers Graça, Ricardo Xavier da Rocha

Background: Intoxication caused by *Senecio* sp is characterized by irreversible damage to liver cells and may be associated with oxidative stress. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the effects of intoxication by *Senecio* sp on lipoperoxidation, antioxidant defenses, and the osmotic resistance of erythrocytes in cattle. **Methods:** Blood samples from 30 intoxicated animals (group 1) and 30 healthy animals (group 2) were analyzed. The diagnosis of poisoning by *Senecio* sp was based on histopathologic lesions verified through hepatic biopsy. The following biochemical parameters of oxidative stress in the erythrocytes were determined: thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) activity, and nonprotein sulfhydryl (NPSH) groups. Erythrocyte osmotic fragility also was evaluated. **Results:** TBARS concentration and CuZnSOD activity were significantly ($P < .001$) higher in group 1 when compared with group 2. The concentration of erythrocyte NPSH groups was significantly ($P < .03$) lower in group 1 when compared with group 2. Osmotic fragility was more pronounced in the erythrocytes of group 1 when compared with group 2 ($P < .001$). **Conclusions:** The results of this study indicate that poisoning by *Senecio* sp causes an increase in lipoperoxidation, oxidation of NPSH groups, and consequently, oxidative stress in bovine erythrocytes that may contribute to hemolysis. These findings may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in cell damage in animals intoxicated by *Senecio* sp. (*Vet Clin Pathol.* 2005;34:353–357)

©2005 American Society for Veterinary Clinical Pathology

Key Words: Bovine, hemolysis, lipid peroxidation, nonprotein sulfhydryl, oxidative stress, red blood cell, *Senecio* sp, superoxide dismutase



In the southern region of Brazil, 50% of the deaths due to toxic plants are caused by *Senecio* sp, which causes great economic loss.¹ Intoxication caused by *Senecio* sp is characterized by irreversible damage to liver cells by the action of pyrrolizidine alkaloids (PAs)² and volatile substances, such as indoles and terpenes, which are present in these plants.^{3,4} The PAs react with macromolecules in the cells in which they are formed or gain access leading to the formation of S-bound protein adducts and DNA crosslinking. The PAs have been shown to have mutagenic activity, and the target of the secondary metabolites is a specific area of the DNA.⁵ Chemical carcinogens such as PAs found in *Senecio* can exert tumorigenicity through secondary mechanisms, such as oxidative stress, induction of lipid peroxidation, formation of endogenous DNA adducts, induction of peroxisome proliferation, and modulation of endocrine disruptors.⁶ Histopathologic alterations caused by *Senecio* are characterized by liver fibrosis, biliary hyperplasia, hepatomegalocytosis, and variable cholestasis.^{2,7,8} It has been demonstrated that the PAs in *Senecio* sp can change the cellular membrane.^{3,4}

Senecio sp poisoning in sheep has been shown to be associated with secondary hemolytic crisis⁹ in response to massive copper release into the bloodstream, which causes chronic hepatic damage.¹⁰ Because copper is a pro-oxidant

metal,¹¹ its massive release might be associated with oxidative stress and possibly a predisposition to hemolysis. However, we are unaware of reports in the literature attesting to this type of poisoning in cattle.

Because of their role in the transportation of oxygen via hemoglobin, erythrocytes are constantly exposed to reactive oxygen species (ROS).^{12–14} The oxidation of erythrocytes has been studied extensively as a model of oxidative damage of biomembranes, and it has been shown that ROS attack the membrane of erythrocytes to induce the oxidation of lipids and proteins, eventually causing hemolysis.^{15,16}

Previous studies have described an increase in the osmotic fragility of the erythrocytes in experimental models of oxidative stress.^{15,17,18} The damage to the antioxidant system or the increase in ROS production is responsible for alterations in the cellular structure of the erythrocytes.¹⁴ It is known that an imbalance in the oxidant-antioxidant status of the cell is associated with oxidative stress, and that it causes a cascade of events within the cell, such as lipid peroxidation and protein oxidation,^{14,19} which might be the cause of hemolysis and anemia.

The objective of this study was to investigate the relationship among oxidative stress in bovine erythrocytes, antioxidant response, and the deleterious effects of intoxication by *Senecio* sp in the susceptibility to hemolysis.

From the Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS, Brasil. Corresponding author: Julio Cesar Mendes Soares (jcmsoares@yahoo.com.br). ©2005 American Society for Veterinary Clinical Pathology

Materials and Methods

Animals

Sixty Red Angus beef heifers between the ages of 18 and 24 months were divided into 2 groups: group 1 was the intoxicated group, and group 2 was the control group. Group 1 was grazed in a paddock highly overgrown with *Senecio* sp, and group 2 was maintained in an unaffected paddock. The animals were kept in these paddocks for approximately 7 months (from June 2003 to January 2004). Animals belonged to a private cattle ranch and were referred by a local veterinarian; after diagnosis the cattle were sent to slaughter. All procedures used were approved by the University Committee for ethical use of animals in teaching and research.

The diagnosis of poisoning by *Senecio* sp was based on the finding of characteristic histopathologic lesions (fibrosis, biliary hyperplasia, and hepatomegalocytosis) by hepatic biopsy. Liver samples were collected on the same day as blood samples (see below). The biopsy of hepatic tissue was done using the method described by Braga et al.²⁰ The fragments of liver tissue were fixed at 10% formalin and sent to the Laboratory of Animal Pathology at the Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, Brazil), where they were processed with plated paraffin (5 µm) and stained with H&E.

Blood sample collection

Blood samples were taken from the 30 intoxicated animals (group 1) and 30 healthy animals (group 2). Ten-milliliter samples were collected from the jugular vein and were processed within 1 hour after collection. Five milliliters of blood were transferred to sterile tubes of polypropylene containing heparin for determination of the osmotic fragility of erythrocytes and to determine erythrocyte biochemistry, including thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) activity, and the concentration of nonprotein sulfhydryl (NPSH) groups. For the hemogram, 2.5 mL of blood were transferred to sterile, polypropylene tubes containing EDTA; the remaining 2.5 mL were transferred to sterile, polypropylene tubes for serum biochemistry and serum copper assays.

Hemogram and biochemical analyses

Erythrocytes were counted using a hemocytometer, with hemolyzed blood samples excluded. Leukocytes also were manually determined. HCT was measured using the microhematocrit centrifugation method, and MCV and MCH were calculated. A semiautomatic device (Bio Plus-Bio 200 FL, CELM, São Paulo, SP, Brazil) was used for biochemical analyses of serum aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyltransferase (GGT) activities and the results were expressed as U/L. Hemoglobin (Hb) and total serum protein concentration were measured with commercial kits using colorimetric methods (Labtest, Belo Horizonte, MG, Brazil). Albumin concentration was determined by the bromocresol green method, and globulin concentration

was calculated by subtracting the albumin from the total protein concentration.

Biochemical parameters of oxidative stress

Thiobarbituric acid-reactive substances. TBARS were determined in erythrocytes according to the method described by Ohkawa et al.²¹ The blood samples were centrifuged for 10 minutes at 1000g, and erythrocytes were washed 3 times with 0.9% NaCl (wt:vol). Afterwards, the erythrocytes were diluted with 0.9% NaCl, and adjusted to 50% HCT (1:1). This solution was precipitated with 2 volumes of trichloroacetic acid (TCA, 40%), and the supernatant was removed and kept on ice for 30 minutes after centrifugation. TBARS were quantified by the addition of 1 mL of the supernatant fractions to the color reaction medium. The amount of TBARS produced was measured spectrophotometrically at 532 nm, using malondialdehyde (MDA) for construction of the standard curve. Results were expressed as pmol MDA/g Hb. Hemoglobin was determined with a commercial kit using a colorimetric method (Labtest).

CuZnSOD activity. The activity of CuZnSOD in erythrocytes was determined using a method based on the ability of the enzyme to inhibit epinephrine autooxidation at an alkaline pH. The blood samples were centrifuged for 10 minutes at 1000g, and erythrocytes were washed 3 times with 0.9% NaCl (wt:vol). The intracellular CuZnSOD activity in erythrocyte lysates was determined by a kinetic method. The reaction was observed at 480 nm, in accordance with the method described by Sun and Zigman.²² Results were expressed as IU/g Hb.

Nonprotein sulfhydryl groups. The concentration of NPSH groups in the erythrocytes was determined using Ellman's reagent, 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoate (DTNB). Blood samples were precipitated with 2 volumes of 20% TCA. After the samples had been centrifuged at 2000g for 10 minutes, the NPSH groups were quantified by adding 50 µL of the supernatant to the reaction medium, which contained 1 mmol/L of potassium phosphate buffer at pH 7.0 and 0.5 mmol of DTNB at pH 7.0. The concentration was calculated as µmol SH/L in the erythrocytes using reduced glutathione (GSH) for construction of the standard curve, following the method described by Ellman.²³

Serum copper concentration. The analysis of serum copper concentration (expressed as mg/L) was done using flame atomic absorption spectrophotometry (932 AA spectrophotometer, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia) according to the methodology described by Terrés-Martos et al.²⁴

Osmotic fragility test

The osmotic fragility test of erythrocytes is based on measuring the resistance of the cells to lysis in hypotonic NaCl solutions. After collection of heparinized blood, the

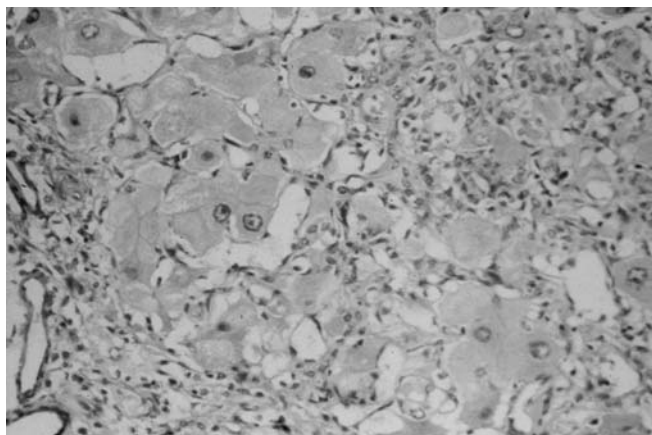


Figure 1. Histologic section of liver tissue from a heifer in group 1, showing fibrosis, biliary ductal hyperplasia, and megalocytosis resulting from *Senecio* sp poisoning. H&E, ×10 objective.

erythrocytes were washed twice with 0.9% NaCl. Erythrocytes were diluted in 0.9% NaCl, with the HCT adjusted to 50% (1:1). An aliquot of 300 μ L of this suspension was added to tubes containing 900 μ L of an NaCl solution (100, 50, and 0 mmol/L) and incubated for 30 minutes at 37°C. After incubation, tubes were centrifuged for 10 minutes at 1500g, and hemoglobin was determined in the supernatant using a commercial kit (Labtest Systems, Belo Horizonte, MG, Brazil). Hemolysis in each tube was expressed as a percentage, with 100% as the maximum value of absorbance of the distilled water (0% concentration of NaCl).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD. The results were evaluated by Student's unpaired *t*-tests and Pearson's correlation coefficients were determined (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL, USA). Differences between the groups were considered significant when $P < .05$.

Results

All cattle were verified to have damage to the hepatocytes consistent with *Senecio* intoxication, as determined by histologic findings, which showed fibrosis, biliary hyperplasia, hepatomegalocytosis, and variable cholestasis (Figure 1). The results of most routine hematologic and biochemical analyses were not significantly different between groups 1 and 2 (Table 1). The serum activities of AST and GGT were significantly higher in group 1 when compared with group 2.

Cattle in group 1 had a significantly higher concentration of TBARS when compared with that in group 2 ($P < .001$) (Table 1). The concentration of NPSH groups in the erythrocytes of group 1 was significantly lower when compared with group 2 ($P < .03$). There was significantly higher CuZnSOD activity, however, in erythrocytes of group 1 when compared with group 2 ($P < .001$). No statistically significant difference was observed in the serum copper levels between groups 1 and 2.

Table 1. Results of hematologic and biochemical tests used to evaluate the oxidative status of erythrocytes from cattle intoxicated with *Senecio* sp (group 1) compared with control cattle (group 2). Data are mean \pm SD.

Analyte	Group 1 (n = 30)	Group 2 (n = 30)
Hemogram		
RBC count ($\times 10^6$ cells/ μ L)	6 \pm 1	6 \pm 1
Hemoglobin (g/dL)	12 \pm 1	12 \pm 2
HCT (%)	36 \pm 6	37 \pm 3
MCV (fL)	57 \pm 4	56 \pm 2
MCH (g/dL)	34 \pm 6	34 \pm 3
WBC count (cells/ μ L)	12,671 \pm 784	13,950 \pm 779
Biochemical Assays		
Total protein (g/dL)	6.7 \pm 9.0	7.2 \pm 7.0
Albumin (g/L)	2.5 \pm 5.0	2.9 \pm 8.0
Globulins (g/dL)	4.2 \pm 1.1	4.3 \pm 1.1
Aspartate aminotransferase (U/L)	113 \pm 29*	82 \pm 11
Gamma glutamyltransferase (U/L)	56 \pm 32*	31 \pm 16
Erythrocyte Oxidative Stress†		
TBARS (pmol MDA/g Hb)	2.4 \pm 0.3*	1.6 \pm 0.1
NPSH (μ mol/L whole blood)	195 \pm 39**	261 \pm 27
CuZnSOD (IU/g Hb)	0.33 \pm 0.06*	0.23 \pm 0.05
Serum Copper		
Copper (mg/L)	0.62 \pm 0.08	0.58 \pm 0.09
Osmotic Fragility Test		
Hemolysis in 100 mmol/L NaCl (%)	16 \pm 2*	8 \pm 1

*Significantly different from control group ($P < .001$).

**Significantly different from control group ($P < .03$).

†TBARS indicates thiobarbituric acid reactive substances; MDA, malondialdehyde; NPSH, nonprotein sulfhydryl groups; SOD, superoxide dismutase.

In the osmotic fragility test, a higher percentage of hemolysis was observed at 100 mmol/L NaCl for group 1 when compared with group 2 ($P < .001$) (Table 1). No differences were observed in hemolysis at 50 or 0 mmol/L NaCl (data not shown). A negative correlation was found between the concentration of NPSH groups and the percentage of hemolysis in cattle in group 1 ($r = -0.62$, $P < .002$).

Discussion

The hepatotoxic effects of PAs in plants of *Senecio* sp have been well reported and are characterized by irreversible damage to hepatocytes.^{7,8,10,25} Animals intoxicated by *Senecio* sp had high serum activities of AST and GGT, which indicated hepatocellular damage and cholestasis or biliary hyperplasia, respectively.²⁶ Histologic findings in the liver included fibrosis, biliary hyperplasia, and hepatomegalocytosis characteristic of hepatic damage by *Senecio* sp intoxication.^{2,27} We also demonstrated evidence for erythrocyte oxidative stress in *Senecio*-intoxicated cattle, based on TBARS and NPSH concentrations, which may be associated with increased erythrocyte fragility. Similar

results have been observed in mice with hepatic damage, as described by Trivedi and Rawal.²⁸ The high CuZnSOD activity in the erythrocytes of animals in group 1 may be interpreted as a compensatory mechanism (increased enzyme synthesis) resulting from increased superoxide radical generation.

Several studies, such as those of Trivedi and Rawal,²⁸ Nicola,²⁹ and Vendemiale et al,³⁰ show the importance of the liver in maintaining redox status and show that chronic hepatic damage promotes oxidation of NPSH groups and an increase in free radicals. This, consequently, may increase the levels of lipid peroxidation and cellular damage.

Increased lipoperoxidation, as observed by the increase in TBARS concentration and the decrease in NPSH concentration in the erythrocytes may reflect a possible decrease in GSH concentration, a tripeptide that is key in protecting erythrocytes from oxidative damage.^{15,17,31–33} The pyrrolic metabolites produced from PAs have been well-studied, and are capable of binding with GSH to form GSH conjugates.⁶

Over 90% of GSH in the systemic circulation results from influx of this peptide from the liver.³⁴ The liver is an important site for the metabolism of toxic substances such as PAs, whereby free radicals often are generated. If the liver is unable to neutralize the oxidants it generates, the ROS can enter the blood and damage the erythrocytes. PAs are metabolized to highly reactive electrophilic compounds that can produce lipid peroxidation and other forms of cell injury.⁶ These reactive metabolites are conjugated with GSH within the liver, resulting in reduced liver GSH concentrations.³⁵ There is evidence that metabolites of PAs enter erythrocytes in liver disease. Erythrocyte GSH concentration has not previously been measured in animals with pyrrolizidine toxicity; however, our finding of lower NPSH concentration in erythrocytes from group 1 indicate that erythrocyte GSH concentration is likely decreased in cattle with PA toxicity. Gradinsk-Vrbanac et al³⁶ demonstrated that a high level of GSH in erythrocytes corresponded with higher resistance to the lipoperoxidation caused by hydrogen peroxide.

Copper is a prooxidant metal that produces hemoglobin oxidation through the Haber-Weiss reaction.¹¹ Copper intoxication has been associated with hemolytic crises secondary to the massive release of copper into the bloodstream.¹⁰ In this study, however, we did not demonstrate an increase in the concentration of copper in the bloodstream. The vulnerability of erythrocytes to osmotic shock is related to membrane properties,³⁷ so it is reasonable to suppose that the increase in osmotic fragility was linked to the increase in lipoperoxidation rather than to increased copper concentration. This may be supported by the significant increase in TBARS concentration and the decrease in NPSH concentration in this study, both of which contribute to or result from an increase in lipoperoxidation in the erythrocytes of *Senecio*-intoxicated cattle.

We can conclude that oxidative stress is present in the erythrocytes of cattle intoxicated with *Senecio* sp, and may contribute to hemolysis. These findings may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in cell damage caused by PAs and other oxidants.

References

- Méndez MC, Riet-Correa F. *Plantas Tóxicas e Micotoxícoses [Toxic Plants and Micotoxicosis]*. Pelotas, Brazil: Editora Universitária; 2000:9–29.
- Driemeier D, Barros CSL. Intoxicação experimental por *Senecio oxyphyllus* (Compositae) em bovinos [Experimental poisoning in cattle by *Senecio oxyphyllus* (Compositae)]. *Pesqui Vet Bras*. 1992;12:33–42.
- Romero A, Zeinsteger P, Teibler P, et al. Lesiones hepáticas inducidas por componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones [Hepatic injury induced by volatile components in mice by *Senecio grisebachii* (margarita)]. *Rev Vet*. 2002;13:15–17.
- Zeinsteger P, Romero A, Teibler P, et al. Toxicity of volatile compounds of *Senecio grisebachii* Baker (margarita) flowers, in mice. *RIA INTA Argentina*. 2003;32:125–136.
- Mattocks AR. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. London, UK: Academic Press; 1986.
- Fu PP, Xia Q, Lin G, et al. Genotoxic pyrrolizidine alkaloids—mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Int J Mol Sci*. 2002;3:948–964.
- Barros CSL, Metzdorf LL, Santos MN, et al. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em ovinos [Experimental poisoning in sheep by *Senecio brasiliensis* (Compositae)]. *Pesqui Vet Bras*. 1989;9:55–67.
- Gava A, Barros CSL. *Senecio* spp: poisoning of horses in southern Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 1997;17:36–40.
- Soli NE. Chronic copper poisoning in sheep: a review of the literature. *Nord Vet Med*. 1980;32:75–89.
- Ilha MRS, Loretti AP, Barros SS, et al. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul [Spontaneous poisoning in sheep by *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) in southern Brazil]. *Pesqui Vet Bras*. 2001;21:123–138.
- Bremmer I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:1069–1073.
- Jozwik M, Jozwik M, Jozwik M, et al. Antioxidant defense of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin Chim Acta*. 1997;267:129–142.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, et al. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem*. 1999;10:159–165.
- Tiano L, Fedeli D, Santroni AM, et al. Effect of three diaryl tellurides and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutat Res*. 2000;464:269–277.
- Kondo H, Takahashi M, Niki E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Lett*. 1997;413:236–238.
- Racek J, Herynková R, Holecek V, et al. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol Res*. 2001;50:383–388.
- Batna A, Fuchs C, Spiteller G. Lipid peroxidation in presence of ebselen. *Chem Phys Lipids*. 1997;87:149–158.
- Fernandez AA, Fink NE. Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: a definition by application of a mathematical model. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38:433–436.
- Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab*. 2000;26:63–176.
- Braga MM, Castilhos LML, Santos MN. Biopsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica [Hepatic biopsy in bovine: proposal of a new technique]. *Rev Centro de Ciências Rurais, Santa Maria*. 1985;15:79–88.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–358.
- Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978;90:81–89.

23. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.
24. Terrés-Martos C, Navarro-Alarcón M, Martín-Lagos F, et al. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ*. 1997;198:97-103.
25. Peterson JE, Culvenor CCJ. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. In: Keeler RF, Tu AT, eds. *Handbook of Natural Toxins: Plant and Fungal Toxins*. Vol. 1. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1983:637-671.
26. Craig AM, Pearson EG, Meyer C. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. *Am J Vet Res*. 1991;52:1969-1978.
27. Barros CSL, Metzendorf LL, Peixoto PV. Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul [Occurrence of poisoning in cattle by *Senecio* spp. (Compositae) in southern Brazil]. *Pesqui Vet Bras*. 1987;7:101-107.
28. Trivedi N, Rawal UM. Hepatoprotective and toxicological evaluation of *Andrographis paniculata* on severe liver damage. *Indian J Pharmacol*. 2000;32:288-293.
29. Nicola M. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Rad Biol Med*. 1996;21:291-295.
30. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, et al. Increased stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon alfa. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;175:130-139.
31. Saito I, Asano T, Takakura K. Neuroprotective effect of antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1998;42:269-277.
32. Zhao R, Masayasu H, Holmgren A. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:8579-8584.
33. Nakamura Y, Feng Q, Kumagai T, et al. Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. *J Biol Chem*. 2002;277:2687-2694.
34. Bianchi G, Bugianesi E, Ronchi M, et al. Glutathione kinetics in normal man and in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*. 1997;26:606-613.
35. Huan JY, Miranda CL, Buhler DR. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology Letters*. 1998;99:127-137.
36. Gradinski-Vrbanac B, Stojevic Z, Milinkovic-Tur S, et al. In vitro susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. *Vet Med Czech*. 2002;47:303-308.
37. Brzezinska SE. Erythrocyte osmotic fragility test as the measure of defense against free radicals in rabbits of different age. *Acta Vet Hung*. 2001;49:413-419.