

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA PELO HERBICIDA CLOMAZONE EM
OVINOS E REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DA ENFERMIDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MAURÍCIO ZACHARIAS FAGUNDES

Uruguaiana, RS, Brasil,
2013

Maurício Zacharias Fagundes

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA PELO HERBICIDA CLOMAZONE EM
OVINOS E REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DA ENFERMIDADE**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Universidade Federal do Pampa,
como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Leite dos Anjos

Uruguaiiana, RS, Brasil,
2013

Maurício Zacharias Fagundes

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA PELO HERBICIDA CLOMAZONE EM
OVINOS E REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DA ENFERMIDADE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal Universidade Federal do Pampa,
como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Veterinária

Dissertação defendida e aprovada em: 09/08/2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bruno Leite dos Anjos
Orientador

Prof. Dra. Maria Elisa Trost

Prof. Dr. Ricardo Pozzobon

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo exemplo de luta e persistência durante a minha vida.

Agradecimentos

*Primeiramente a **Deus**, por ter me proporcionado força e coragem para mais esse caminho percorrido.*

Aos meus pais, Valdir e Solange, e meu irmão Flávio, a base familiar foi o que possibilitou a conquista dos objetivos traçados em minha vida. Auxiliando-me sempre em todos os momentos com muita compreensão e confiança.

A minha namorada Maria Eduarda, por estar sempre presente comigo me auxiliando, com paciência e compreensão.

Ao Professor e Orientador Bruno Leite dos Anjos, pelo companheirismo e amizade e também pelo apoio, com muita paciência e ensinamento, fundamental para conclusão desta jornada. Muito obrigado!

Ao Coordenador Professor Mário Brum e a todos os professores do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal da Unipampa, pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Aos Colegas mestrandos do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal da Unipampa, pela convivência extrovertida e constante trocas de experiências e conhecimentos.

*Aos companheiros de **LPV- Unipampa**, Tiago, Maiara, Lucas, Carol, Adriano, Pedro e Ana, meu sincero agradecimento a todos pela dedicação e amizade e apoio na condução deste trabalho. Foi um bom tempo!*

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta auxiliaram na concretização deste trabalho. O meu agradecimento!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Universidade Federal do Pampa

INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA PELO HERBICIDA CLOMAZONE EM OVINOS E REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DA ENFERMIDADE

AUTOR: MAURÍCIO ZACHARIAS FAGUNDES

ORIENTADOR: BRUNO LEITE DOS ANJOS

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 09 de agosto de 2013.

As neuropatias tóxicas em animais de produção causadas por pesticidas correspondem a um importante grupo de enfermidades degenerativas do sistema nervoso central e periférico. No entanto, pouco se conhece sobre os reais impactos tóxicos de muitos desses produtos em animais e humanos e ao meio ambiente. O clomazone é um herbicida amplamente utilizado na região sul do Brasil por ser potente e supostamente seguro, com baixa toxicidade para animais e humanos. Até o presente não há relatos da intoxicação por esse herbicida em animais domésticos. O presente trabalho relata a intoxicação espontânea e experimental por clomazone em ovinos. De um rebanho com 103 ovinos, 20 animais apresentaram especialmente sinais clínicos neurológicos e respiratórios. A intoxicação foi reproduzida experimentalmente em três ovinos com a administração de 134 mg/kg de peso corporal de clomazone. Tanto nos casos naturais como experimentais o sinais clínicos incluíram taquipnéia, anorexia, apatia e dificuldade de locomoção com debilidade em membros torácicos e pélvicos, além de arrastar de pinças. Macroscopicamente não foram observadas alterações significativas. Microscopicamente, foram observadas especialmente vacuolização em substância branca e alguns vacúolos perineuronais e congestão de vasos das leptomeninges e do neurópilo. Ultraestruturalmente, as alterações vacuolares caracterizaram-se especialmente por tumefação em dendritos e processos astrocitários. A partir dos dados obtidos conclui-se que o clomazone é um agente tóxico capaz de causar neuropatia tóxica em ovinos.

Palavras chaves: Doenças de ovinos, clomazone, neuropatia tóxica, neuropatologia.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

SPONTANEOUS POISONING BY CLOMAZONE HERBICIDE IN SHEEP AND EXPERIMENTAL REPRODUCTION OF DISEASE

AUTHOR: MAURÍCIO ZACHARIAS FAGUNDES

ADVISOR: BRUNO LEITE DOS ANJOS

Date and Place of Defense: Uruguaiana, august 09, 2013

The toxic neuropathies in farm animals caused by pesticides represent an important group of degenerative diseases of the central and peripheral nervous system. However, little is known about the real impact of many of these toxic products on animals and humans and to the environment. The clomazone is a herbicide that has been widely used in southern Brazil and includes one of the most potent herbicides and supposedly safe, with low toxicity to animals and humans. To date, there are no reports of this herbicide poisoning in domestic animals. This study describes the spontaneous and experimental poisoning due to clomazone herbicide in sheep. In a flock of 103 sheep, approximately 20 showed clinical signs especially neurological and respiratory. The poisoning was experimentally reproduced in three sheep with the administration of 134mg/kg body weight of clomazone. Both in natural and experimental cases the clinical signs included tachypnea, anorexia, apathy and limited mobility with weakness in forelimbs and hind limbs, drag tweezers, and gait changes. Macroscopically, there were no significant changes. Microscopically, were observed especially vacuolization in the white matter of brain, perineuronal vacuoles and, hyperemia congestion of the leptomenigeal and neuropil vessels. Ultrastructurally, the vacuolar lesions in the brain correspond to dendritic and astrocytic processes swelling. From the data obtained it was concluded that the clomazone is a toxic agent capable of causing toxic neuropathy in sheep.

Keywords: Diseases of sheep, clomazone, toxic neuropathy, neuropathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Fórmula do Clomazone (2-(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona).....15

Artigo

Figura 1. Área da propriedade com pastagem desecada após contato com deriva de clomazone administrado por via aérea.....41

Figura 2. Ovino 1. Observa-se membro torácico direito com debilidade e articulação cárpica flexionada com arrastar das pinças.....41

Figura 3. Ovino 1 do surto com acentuada perda da lã na região da cabeça e crostas brancacentas nas orelhas.....42

Figura 4. Ovino 1 intoxicado naturalmente por clomazone com perda de lã e pelos e pequenas feridas com crosta na região periocular direita.....42

Figura 5. Cordeiro exposto naturalmente ao clomazone com perda dos pelos da orelha e crostas brancacentas nas orelhas.....43

Figura 6. Cordeiro exposto naturalmente ao clomazone. Imagem aproximada demonstrando perda dos pelos da orelha e crostas brancacentas nas orelhas, visualizada mais próxima.....43

Figura 7. Ovino 1. Seção do pulmão com moderada proliferação de tecido conjuntivo, com espessamento dos septos interalveolares, proliferação de pneumócitos II e congestão. HE, 10X.....44

Figura 8. Ovino 1. Observa-se uma seção do pulmão com moderada proliferação de tecido conjuntivo corado em azul e espessamento dos septos interalveolares. Tricrômico de Masson, 10X.....44

Figura 9. Fígado. Há leve vacuolização de hepatócitos da região centrolobular. HE, 10X.....45

Figura 10. Ovino 1. Rim. Cilindros hialinos na luz de túbulos contorcidos.....45

Figura 11. Ovino 1. Encéfalo. Tálamo. Há vacuolização na substância branca e congestão acentuada de vasos do neurópilo. HE, 10X.....46

Figura 12. Ovino 1. Encéfalo. Óbex. Observa-se um grande vacúolo perineuronal que comprime o pericario neuronal. HE, 40X.....46

Figura 13. Ovino 1. Observa-se leve infiltrado linfoplasmocitário em vaso do neuropilo na região medular do cerebelo. HE, 20X.....47

Figura 14. Ovino 1. Encéfalo. Cerebelo. A imagem apresenta múltiplos e grandes vacúolos perineuronais próximos às células de Purkinje. HE, 40X.....	47
Figura 15. Ovino 2. Encéfalo. Observam-se pequenos vacúolos na substância branca dos núcleos da base. HE, 4X.....	48
Figura 16. Ovino 2. Hipocampo. Observa-se leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular no neurópilo. HE, 20X.....	48
Figura 17. Ovino 3. Encéfalo. Córtex frontal. Hemorragia no espaço de Virchow-Robin de vaso do neurópilo. HE, 20X.....	49
Figura 18. Ovino 5. Encéfalo. Óbex. Podem ser observados vacúolos perineuronais e na substância branca. HE, 20X.....	49
Figura 19. Ovino 5. Encéfalo. Núcleos da base. Observa-se congestão difusa moderada e discreta hemorragia perivascular no neurópilo. HE, 10X.....	50
Figura 20. Ovino 5. Rim. Visualiza-se uma área de necrose de células epiteliais de túbulos contorcidos proximais. Nota-se picnose e gotículas de proteína na luz de túbulos. HE. 20X.....	50
Figura 21. Ovino 5. Encéfalo. Tronco encefálico. Neurônio (N) com as cisternas do retículo endoplasmático dilatadas, mitocôndrias tumefeitas e com lise das cristas e presença de vacúolos ao seu redor em consequência de processos astrocitários muito tumefeitos. Presença de sinapse entre dendrito e neurônio (seta). Astrócito (A).....	51
Figura 22. Ovino 5. Encéfalo. Tronco encefálico. Dendrito tumefeito. Vesículas de neurotransmissores (seta). Neurônio exibindo dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso. Maior aumento da figura anterior.....	51
Figura 23. Ovino 5. Encéfalo Tronco encefálico. Sinapse axossomática (entre D e N). Axônios tumefeitos e com restos de membrana (*). Axônio tumefeito e com desaparecimento dos microtúbulos (seta). Dendrito (D). Neurônio (N).....	52
Figura 24. Ovino 4. Encéfalo. Tronco encefálico. Observa-se astrócito tumefeito e circundado por vários prolongamentos astrocitários tumefeitos. No axônio da seta branca há uma mitocôndria tumefeita com a membrana rompida. Na seta preta este evento ainda não aconteceu. Note uma mitocôndria muito tumefeita com ruptura e desaparecimento das cristas, presença de um vacúolo e os microtúbulos já estão afastados entre si pelo acúmulo de líquido.....	52
Figura 25. Ovino 4. Encéfalo. Tronco encefálico. Vacuolização do neurópilo. Note a relação axônio/mielina (seta preta, axônio não afetado). Compare com o axônio tumefeito (*) e ao lado axônio com uma mitocôndria tumefeita, com a matriz eletrodensa, restos de membrana e com a ruptura da membrana mitocondrial (seta branca).....	53

Figura 26. Ovino 4. Fígado. Hepatócitos. Vacúolo delimitado por membrana com conteúdo granular (região superior). Vacúolos de lipídeos de diferentes tamanhos (*). Observam-se mitocôndrias tumefeitas e com lise das cristas (note os resquícios de cristas).....53

LISTA DE QUADROS

Revisão Bibliográfica

Quadro1. Sinais clínicos, lesões e referências bibliográficas dos principais pesticidas em animais domésticos.....7

Artigo

Quadro 1. Doses administradas, sinais clínicos e evolução da intoxicação espontânea e experimental por clomazone em ovinos.....37

Quadro 2. Valores hematológicos de ovinos intoxicados experimentalmente por clomazone em diferentes fases da intoxicação.....38

Quadro 3. Distribuição e intensidade das lesões observadas no sistema nervoso central de ovinos intoxicados naturalmente e experimentalmente pelo herbicida clomazone.....39

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VII
LISTA DE QUADROS.....	IX
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Principais neuropatias tóxicas em animais de produção.....	03
2.1.1 Principais pesticidas que causam intoxicação em animais.....	05
2.1.2 Intoxicação por Organofosforados e carbamatos.....	09
2.1.3 Intoxicação por Closantel.....	11
2.1.4 Intoxicação por Paraquat.....	12
2.2 Clomazone	15
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos Gerais.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
5 CONCLUSÕES.....	54
6 PERSPECTIVAS	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Neuropatias tóxicas do sistema nervoso incluem comumente em desordens que levam a doenças neurodegenerativas e, em menor frequência as axonopatias nos animais. Estas condições provocam lesão tecidual em grandes secções do sistema nervoso, resultando até mesmo em perda de populações de células neuronais específicas no SNC (Summers et al., 1995; Rech et al., 2006; Sisó et al., 2006).

Intoxicações por plantas, metais pesados, herbicidas, inseticidas e inúmeros medicamentos, especialmente os destinados ao controle de endoparasitoses são comuns em animais de rebanho e inclusive humanos (Jolly & Walkley, 1997; Webb, 1983; Jortner et al., 2000; Riet-Correa et al., 2009; Souza et al., 1996; Furlan et al., 2009 b).

O uso intensivo dos pesticidas agrícolas, apesar de favorecer a agricultura, levam ao acúmulo e persistência no ambiente. Dessa forma, pode ocorrer a contaminação do solo, da água e do ar, resultando em toxicidade ao meio ambiente. O solo necessita fertilidade, que por sua vez depende de características físicas, químicas e biológicas, que em equilíbrio, são essenciais para a produtividade de um sistema agrícola sustentável. Atualmente, o Brasil é o país que mais utiliza herbicidas no mercado mundial, que representa cerca de 56% do total comercializado (Peters, 2011). A utilização desses produtos em lavouras pode levar à intoxicação em animais e humanos. No entanto, os dados sobre a capacidade de induzirem quadros tóxicos em animais e humanos são escassos.

Clomazone é um herbicida largamente utilizado em lavouras de arroz no Brasil e com eficácia comprovada sobre gramíneas invasoras desta cultura (Crestani, 2004) e atualmente utilizado como um produto seguro para humanos e ao meio ambiente. Porém, pouco se conhece sobre o seu efeito tóxico em animais.

O Rio Grande do Sul possui um dos maiores rebanhos de ovinos do país, com aproximadamente 3.991.612 milhões de cabeças (IBGE, 2011) e, é um dos maiores produtores de arroz do Brasil. Muitos pecuaristas gaúchos consorciavam a criação de animais com a lavoura, e por isso os riscos de intoxicação por herbicidas, como o clomazone são elevados.

Dessa forma é de extrema importância o conhecimento detalhado de casos da intoxicação por esses produtos. O presente trabalho apresentou investigou os riscos e comprovou os aspectos que podem levar ao desenvolvimento da intoxicação por

clomazone em ovinos estabelecendo dados que podem auxiliar técnicos e produtores na identificação, prevenção e controle dessa intoxicação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Principais neuropatias tóxicas em animais de produção

As doenças do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de animais de produção apresentam etiologias variadas, das quais se destacam os agentes infecciosos e tóxicos e correspondem a um grupo importante de patologias que causam perdas econômicas impactantes em todo o mundo (Stamp et al., 1959; Jolly & Walkley, 1997, Summers et al., 1995).

Dentre os vários grupos de doenças que afetam o SNC e SNP se enfatizam as doenças degenerativas e as axonopatias tóxicas por sua complexidade quanto aos mecanismos patogênicos e variabilidade de agentes etiológicos. As doenças degenerativas do sistema nervoso central e as axonopatias correspondem, respectivamente, a patologias tóxicas que levam a degeneração da substância branca e cinzenta do SNC e de axônios no sistema nervoso periférico (Summers et al., 1995; Radostits et al., 2002; Maxie & Youssef, 2007; Zachary, 2007).

Além disso, podemos também citar as neuropatias de origem hereditária (Gordy et al., 1967), condições descritas em ovinos da raça suffolk, nos Estados Unidos, possivelmente associadas a um gene recessivo. Nesses casos são descritas alterações no SNC com a presença de esferóides axonais.

Dentre as neuropatias de origem tóxica, destacam-se as intoxicações que ocorrem pela ingestão de plantas tóxicas e pesticidas que são descritas no mundo inteiro, como formas de doenças neurológicas. Plantas dos gêneros *Astragalus*, *Swainsona* e *Oxytropis*, causam α -manosidoses em espécies como equinos, bovinos, ovinos e caprinos nos Estados Unidos, México, Canadá e Austrália (Van Kampen & James, 1969; Smith, 2006).

No Brasil, as principais plantas que causam neuropatia tóxica são *Sida carpinifolia* que causa doença do armazenamento lisossomal, caracterizada por vacuolização neuronal descritas caprinos (Driemeier et al., 2000), ovinos (Seitz et al., 2005), bovinos (Furlan et al., 2009) e animais silvestres (Anjos, 2010) e *Solanum fastigiatum* que induz neurolipidose caracterizada por vacuolização total ou parcial de neurônios de Purkinge e formação de esferóides axonais na camadagranular e na substância branca do cerebelo de bovinos (Riet-Correa et al., 1983; Barros et al., 2006; Rech et al., 2006).

Intoxicações por pastagens compostas por *Helichrysum argyrosphaerum* foram diagnosticadas em ovinos e cabras, na África do Sul, nas quais foram descritas alterações histológicas como vacuolização da substância branca no sistema nervoso (Van der Lugt et al., 1996).

No Brasil, inúmeros estudos com base na identificação e controle dessas doenças vêm sendo realizados especialmente para as espécies bovina e equina. Embora diversas doenças do SNC de ovinos e caprinos sejam relatadas no Brasil, seus reais impactos são pouco conhecidos e muitos ainda são imprecisos na maioria dos estados do país (Guedes, 2006; Riet-Correa et al., 2007).

Na região Sul do Brasil, bem como nos estados do Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, são relatadas doenças neurológicas tóxicas em ovinos pela ingestão de plantas tóxicas como *Ateleia glazioviana* “timbó” (Stigger et al., 2001; Raffi et al., 2006) *Tetrapteryx multiglandulosa* (Riet-Correa et al., 2005) e *Halimium brasiliense* (Riet-Correa et al., 2009).

Em se tratando de pesticidas e medicamentos também são descritos inúmeros casos de doença neurológica em animais no Sul do país, dos quais se destacam as intoxicações por organofosforados e carbamatos em bovinos (Soares et al., 2002; Oliveira-Filho et al., 2010), em búfalos (Grecco et al., 2009) e ovinos (Souza et al., 1996), além da intoxicação por closantel em ovinos e caprinos (Ecco et al., 2008; Furlan et al., 2009).

Clinicamente as intoxicações são caracterizadas de modo em geral por convulsões, acompanhadas de tremores musculares, opistótono, nistagmo, tetania e movimentos de pedalagem. Outros sinais clínicos incluem incoordenação motora e sialorreia, e também pode ocorrer depressão, ataxia, paralisia, midríase bilateral irresponsiva e coma (Radostits et al., 2002; Maxie & Youssef, 2007; Zachary, 2007).

As doenças do SNC e SNP geralmente não cursam com alterações macroscópicas o que pode dificultar o diagnóstico. Estas enfermidades podem induzir edema axonal, esferoides axonais, cromatólise e degeneração, e necrose neuronal principalmente no tronco encefálico e medula espinhal (Summers et al., 1995; Maxie & Youssef, 2007) semelhante ao que ocorre na intoxicação por *Halimium brasiliense* em ovinos (Riet-Correa et al., 2009). A vacuolização ou a espongiose do sistema nervoso central também pode ser observada e ocorre de forma semelhante ao encontrado nos casos de intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Stigger et al., 2001) e *Tetrapteryx*

multiglandulosa (Riet-Correa et al., 2005) em ovinos e bovinos. Em virtude da semelhança das lesões das doenças neurológicas em ruminantes causadas pelos vários agentes tóxicos citados anteriormente e pela dificuldade em compreender a epidemiologia das intoxicações, torna necessário o uso de técnicas de diagnóstico mais acuradas, as quais muitas vezes não estão disponíveis em todos os laboratórios de diagnóstico e impossibilitam o diagnóstico conclusivo de algumas intoxicações.

2.1.1 Principais pesticidas que causam intoxicação em animais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define pesticida ou praguicida de forma ampla como toda substância capaz de controlar uma praga, que possa oferecer risco ou incômodo às populações e ambiente. Os principais inseticidas ou anti-helmínticos incluem os organofosforados e carbamatos, que possuem diferentes composições químicas, com uso amplamente difundido na Agricultura e na Medicina Veterinária. Intoxicações acidentais em animais de importância pecuária são comuns e provocam sinais clínicos principalmente neurológicos (Guglielmone et al., 2001; Radostits et al., 2002; Castro et al., 2007). As intoxicações por medicamentos e pesticidas são relatadas tanto em animais domésticos e em humanos, e tem como fatores epidemiológicos mais frequentes o contato acidental e erros na administração dos produtos (Grecco et al., 2009; Oliveira-Filho et al., 2010).

Dentre os inseticidas mais utilizados estão os organofosforados que apresentam várias denominações comerciais como metaminofós, dimixion, fenitroion, fention, fosfomet, tricolorfon, clorfenvinfos, ethion e diazinon, e com menor frequência os carbamatos como carbaril, aldicarb, carbofuran, methomyl, propoxur, oxamil, pirimidicarb e dioxacarb (Barbosa et al., 2005).

Da mesma forma, com ação anti-helmíntica e utilizado em grande escala na medicina veterinária principalmente em ovinos, o closantel atua contra *Haemonchus contortus*, *Fasciola hepatica* e larvas de *Oestrus ovis* interferindo na fosforilação oxidativa desses parasitos (Gill et al., 1999; Ecco et al., 2006; Furlam et al., 2009).

Herbicida é um grupo de compostos químicos utilizados para o controle e erradicação de plantas invasoras em culturas como exemplo a esse grupo, o paraquat, é um herbicida amplamente usado para o controle pré-emergente de ervas daninhas em culturas. Comercialmente podem ser utilizados unicamente ou associado com diquat.

Embora estes produtos químicos possam ser rapidamente inativados em contato com o solo, os animais podem ser intoxicados através de pastagens ou até mesmo por rações expostas ao mesmo (Philbey & Morton, 2001; Suntres, 2002; Serra et al., 2003).

O Quadro 1 demonstra o resumo de algumas características principais desses grupos de pesticidas. Incluindo outros pesticidas que também compõem o grupo de maior importância em se tratando de condições tóxicas para os animais.

Quadro 1- Sinais clínicos, lesões e referências bibliográficas dos principais pesticidas que causam intoxicação em animais domésticos.

Pesticidas	Espécies Afetadas	Mecanismo de Ação	Sinais Clínicos	Principais Lesões	Referências
Organofosforados Carbamatos	Ovino Bovino Búfalo	Inibe a acetil colinesterase	Náusea, tenesmo, dispneia, bradicardia rigidez muscular, tremores musculares, debilidade, paresia e paralisia.	Degeneração axonal principalmente da parte distal dos axônios nos nervos periféricos, caracterizando edema e perda de mielina.	Pugh, 1975 Souza, et al., 1996 Grecco, et al. 2009 Oliveira-Filho, et al., 2010
Closantel	Ovino Caprino	Inibe a fosforilação oxidativa	Depressão, ataxia, incoordenação motor e reflexo pupilar diminuído a ausente e cegueira bilateral.	‘Status spongiosus’ no sistema nervoso central e neuropatia compressiva no nervo óptico, degeneração e/ou atrofia da retina.	Gill et al. 1999 Barlow et al., 202 Ecco et al. 2006
Paraquat	Ovino Bovino Cão	Inibe a catalase	Excitação, ataxia, diarréia, dificuldade respiratória e convulsões.	Pulmão: congestão, hemorragia edema intersticial, e necrose. SNC: esferóides axonais em medula oblonga.	Philbey & Morton, 2001 Beasley, 1999, Almeida, et al. 2007

Continuação do Quadro 1

Organoclorados	Ovino Bovino Equino	Interferem na membrana celular	na Debilidade dos membros, salivação, ataxia, tremores musculares, hipersensibilidade, excitação, decúbito lateral com convulsões tônico-clônicas e movimentos de pedalagem.	Pulmão: enfisema e edema alveolar e intersticial. Rins: congestão dos glomérulos e intensas hemorragias. Encéfalo: leucoencefalomalácia.	Frank et al., 1991 Rivero et al., 2011 Riet-Correa et al., 2007
Abamectina	Bovino	Libera ácido gama aminobutírico	Hipotonia muscular generalizada e depressão progressiva.	S/A	Seixas et al., 2006
Piretroides	Bovino	Interfere nos canais de sódio	Salivação, hiperexcitabilidade, tremores, convulsões, dispneia, prostração e morte.	S/A	Mendonça et al., 2010
Amitraz	Equino Bovino Gato	Inibição da enzima monoaminoxidase	Apatia, dificuldade de apreensão, mastigação e deglutição, arrastar das pinças dos cascos no solo, priapismo, sensibilidade abdução dos membros e incoordenação.	S/A	Duarte et al., 2003 Kizil et al., 2008 Andrade et al., 2007

2.1.2 Intoxicação por Organofosforados e Carbamatos

Organofosforados e carbamatos são produtos usados em atividades agropecuárias como inseticidas para lavouras e antiparasitários para animais. Intoxicações acidentais ocorrem durante aplicações de inseticidas em plantações ou uso de antiparasitários em concentrações inadequadas (Barros et al., 2006). O uso incorreto desses produtos pode acarretar grandes prejuízos na pecuária e a intoxicação ocorre na grande maioria das vezes por contaminação da água, alimentos, pastagens e uso de concentrações exageradas do produto (Boermans et al., 1984; Radostits et al., 2000) na mesma forma, durante as aplicações sobre culturas, e que serão utilizadas na forma de feno como fonte de alimento para os animais. (Barros & Driemeier, 2007).

Esses produtos são rapidamente absorvidos pela pele, conjuntiva, mucosa do trato alimentar ou inalados (Radostitis et al., 2000), sendo que a taxa de absorção cutânea é influenciada pelo solvente utilizado (Barros et al., 2006). Existem alguns fatores de risco relevante para ocorrência da intoxicação como idade do animal, estresse, privação de água, frio intenso e sexo. E, também o método de aplicação como pour on em comparação com a pulverização demonstrando um efeito em até 24 horas de atraso (Radostitis et al., 2000; Grecco, 2009).

Segundo Pugh, 1975 relatou intoxicação em bovinos pela ingestão de organofosforados em Ontário província do Canadá. Também em Otário, Canadá foi relatado em gado de leite (Boermans et al., 1984).

Em trabalhos de intoxicação experimental tem sido demonstrado que a ordem de toxicidade desses produtos difere amplamente entre búfalos e outras espécies domésticas, sendo assim, doses utilizadas em bovinos não deve ser feita para bubalinos (Raina et al., 1990; Raina et al., 1991). No Brasil há relatos de surtos da intoxicação por organofosforados em bovinos no Distrito Federal (Castro et al., 2007), no Pará (Barbosa et al., 2003), e em Santa Catarina (Gava et al., 2001) e no Rio Grande do Sul (Grecco et al., 2009; Oliveira-Filho et al., 2010) e em ovinos (Souza et al., 1996) e por carbamatos no Rio Grande do Sul (Soares et al., 2002).

Entre os bovinos as raças zebuínas parecem ser mais suscetíveis (Barros & Driemeier, 2007). Tanto os organofosforados quanto os carbamatos inibem a acetilcolinesterase. Os organofosforados agem promovendo a fosforilação da enzima formando uma ligação irreversível, enquanto os carbamatos carbamitam a acetilcolinesterase, criando uma ligação reversível, ou seja, mais forte (Frank et al.,

1991), levando ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares, resultando em constante despolarização e hiperestimulação (Dalto et al., 2011; Zachary, 2007).

Na intoxicação por organofosforados nos casos não letais a recuperação pode ocorrer em até 48 horas. No entanto, nas intoxicações crônicas, que ocorrem quando o produto é aplicado várias vezes em intervalos pequenos de alguns dias, sinais clínicos moderados podem ser observados de forma repetida em intervalos de alguns dias (Gava, 2001; Grecco, 2009).

Os sinais clínicos estão associados com o excesso de acetilcolina acumulada e uma hiperestimulação do sistema nervoso parassimpático. Além disso, os efeitos também podem ser divididos em três categorias: muscarínicos, nicotínicos e do sistema nervoso central. Os efeitos muscarínicos incluem sudorese, sialorreia, lacrimejamento, hipermotilidade gastrointestinal, náusea, vômito, diarreia, tenesmo, dispneia, bradicardia e miose. Os efeitos nicotínicos são caracterizados por rigidez muscular, tremores musculares, debilidade, paresia, e paralisia. No sistema nervoso central, o acúmulo de acetilcolina causa inquietação, ansiedade, ataxia hiperatividade, convulsão, depressão mental profunda e coma (Pugh, 1975; Boermans et al., 1984; Barros & Driemeier, 2007).

Os sinais clínicos de um quadro clássico de intoxicação aguda incluem lacrimejamento, miose, salivação, tremores musculares, bradicardia, fraqueza muscular, ataxia, dispneia grave e diarreia. (Pugh, 1975; Boermans et al., 1984; Garcia et al., 2006; Maxie & Youssef, 2007; Zachary, 2007; Dalto, 2011).

Como alterações histológicas a principal lesão é a degeneração axonal principalmente da parte distal dos axônios nos nervos periféricos, caracterizando edema e perda de mielina (Jones & Hunt, 2000, Maxie & Youssef, 2007). Pode ocorrer, também, degeneração hepática e renal (Maxie & Youssef, 2007).

O diagnóstico é feito pelo histórico que indica a exposição dos animais às substâncias tóxicas, pelo quadro clínico e pela ausência de achados macroscópicos significativos em animais necropsiados. Ocorre depressão dos níveis normais de colinesterase nos tecidos e no sangue. A intensidade da diminuição da colinesterase, no entanto, nem sempre é proporcional à gravidade da intoxicação, e uma diminuição abrupta é mais significativa que uma diminuição gradual (Khan, 2001; Barros & Driemeier 2007).

Segundo Soares et al., (2002), outra forma de diagnóstico importante é a coleta de conteúdo do rúmen e abomaso e fragmentos de fígado e rim para dosagem de organofosforados e carbamatos por métodos cromatográficos.

2.1.3 Intoxicação por Closantel

Closantel é um antiparasitário da classe dos salicilanilídeos, que atua desacoplando a fosforilação oxidativa, utilizado principalmente em bovinos, ovinos e caprinos (Barlow et al., 2002; Furlan et al., 2009; Van der Lugt & Venter, 2007). Quando usado pelas vias oral e intramuscular tem ação contra *Haemonchus contortus*, *Fasciola hepatica* e *Oestrus ovis*. O closantel, quando administrado em doses superiores às recomendadas leva à cegueira, com degeneração da retina e edema intramielínico do nervo óptico e outras áreas do sistema nervoso central (Gill et al., 1999; Sakhaeaa e Derakhshanfar, 2010) e em alguns casos, até mesmo à morte (Furlan et al., 2009).

Segundo Ecco et al. (1999), um surto de intoxicação foi diagnosticado em um rebanho de 27 caprinos no Rio Grande do Sul. Os animais tinham entre 7 e 8 meses de idade e foi administrado closantel com uma dose 10 vezes superior à recomendada. Ocorreu a morte de 7 animais, 5 foram sacrificados e os demais se recuperaram dos sinais clínicos agudos, porém ficaram cegos.

Há também relatos de intoxicação experimental em ovinos (Gill et al. 1999), caprinos (Ecco et al., 2006).

As principais alterações histológicas observadas em intoxicação por este fármaco caracterizam-se por degeneração da retina, com degeneração das células da camada nuclear interna e das células fotorreceptoras, picnose e perda de células na camada nuclear externa e perda de neurônios da camada ganglionar. Edema intramielínico também pode ser observado no nervo óptico. Posteriormente, levando uma condição de compressão, observa-se necrose, infiltração por células inflamatórias, principalmente de macrófagos e conseqüentemente fibrose da porção intracanalicular do nervo por fim resultando em degeneração Walleriana. Podem ainda ser observados edema intramielínico, preferentemente perivascular e perineuronal no trato óptico e na substância branca de outras regiões do sistema nervoso, incluindo pedúnculos cerebelares, cerebelo e tronco encefálico (Ecco et al., 1999; Gill et al., 1999; Barlow et al., 2002; Furlan et al., 2009; Van der Lugt & Venter, 2007; Sakhaeaa &

Derakhshanfar, 2010). Lesões hepáticas caracterizadas por degeneração e necrose de hepatócitos podem ocorrer (Ecco et al., 1999) .

O diagnóstico baseia-se no histórico de tratamento prévio com closantel, no quadro clínico e na observação das principais alterações histológicas características dessa condição. Deve ser realizado o diagnóstico diferencial para intoxicação por outras drogas que também levam à cegueira, como por exemplo, a rafoxanida e o hexacloretano. Quanto ao tratamento, não há uma solução eficiente para intoxicação. Os sinais clínicos podem ser reversíveis, no entanto a condição de cegueira pode ser permanente. Como prevenção deve-se ter cautela no uso da dose correta a ser aplicada no animal (Barbosa et al., 2005).

2.1.4 Intoxicação por Paraquat

Considerado o herbicida mais efetivo contra ação de gramíneas, o paraquat é amplamente utilizado para o controle de ervas daninhas, em renovação de pastagens e manutenção de forrageiras. É usado juntamente com outros produtos após semeadura e pré-colheita, controlando a vegetação aquática em canais de irrigação, reservatórios e açude (Caldas et al.,2000).

O paraquat (1-1'-dimetil-4-4'-bipiridilo), é um herbicida de contato não seletivo, é considerado um sal de amônia bi quaternária, usualmente sintetizado na forma de sal diclorídrico. Este herbicida interrompe o processo de fotossíntese nas plantas. É atualmente o terceiro pesticida mais vendido no mundo, justamente por conferir vantagens como diminuir o trabalho, ter baixo custo, sendo acessível para os agricultores nos países em desenvolvimento (Wesseling et al. 2001).

Comumente é comercializado com Gramoxone[®], Gramocil[®], Agroquat[®], Gramuron[®], Paraquat[®], Paraquol[®] e também em misturas com outros princípios ativos, como o Secamato[®] (Oga et al., 2003).

De todos os herbicidas, sem dúvida, o paraquat tem sido o principal responsável pelo maior número de intoxicações humanas graves, muitas delas fatais, seja por acidentes, pela exposição ocupacional ou, ate mesmo, pelas tentativas de suicídio. Em razão da sua extrema toxicidade, é muito possível que esse herbicida também possa representar alto risco aos animais em geral, tanto pelo contato direto, como pela exposição indireta a tal composto (Spinosa, et al., 2008).

A absorção oral, dérmica e respiratória dos herbicidas bipiridílios é pequena, mas a presença de solventes e outras substâncias que facilitam a sua absorção pode aumentar o risco toxicológico. No caso do paraquat, a sua toxicidade é muito alta e predominantemente pulmonar, local onde a concentração ocorre de forma acentuada em comparação com outros tecidos. Sua eliminação renal é extensa, e, em estudos experimentais, mesmo após 21 dias de sua exposição oral, ainda se encontrava na urina (Spinosa et al., 2008).

O mecanismo de ação tóxica se resume a duas fases distintas. A fase consuptiva, que tem origem a partir da lesão de pneumócitos tipo I e II, seguida por descamação tecidual. Ocorrendo a formação de edema, alveolite e exudação de eritrócitos e leucócitos granulócitos, ou seja, inflamação e hemorragia, e a fase proliferativa que se caracteriza pela proliferação acentuada de fibroblastos gerando fibrose pulmonar (alveolar e intersticial), levando à insuficiência respiratória (Caldas et al., 2000). Outros efeitos tóxicos do paraquat incluem necrose do miocárdio, necrose hepática periacinar, necrose de túbulos renais e adrenocortical (Kelly et al., 1978).

Não estão estabelecidos valores tóxicos letais para os animais. Mas segundo Beasley, (1999) a dose letal média (DL50) via oral é de 35mg kg⁻¹ para gatos; 25-50mg kg⁻¹ para cães e suínos; 50-75mg kg⁻¹ para ovinos e de 35-50mg kg⁻¹ para bovinos.

Os animais de rebanho pode acidentalmente ter acesso às áreas pulverizadas e, em muitas ocasiões, como em áreas de silvicultura e também em áreas que não impeçam o acesso dos animais, é impossível manter o rebanho sempre afastado da pastagem pulverizada (Calderbank et al., 1968). A intoxicação por água contaminada já foi descrita em ovinos (Philbey & Morton, 2001).

Após a exposição, os sinais clínicos da intoxicação podem ter início em horas a três dias, dependendo do grau de exposição. Se grandes quantidades de paraquat são ingeridas os sinais clínicos agudos incluem excitação, ataxia, diarreia, angústia respiratória e convulsões (Beasley, 1999).

As mucosas dos animais que entram em contato com o paraquat podem estar irritadas e até ulceradas. Em cães, o início dos sinais clínicos ocorre caracteristicamente 1 a 3 dias após a sua exposição. Os sinais clínicos iniciais nestes animais incluem vômito e depressão, desidratação. Os efeitos pulmonares iniciais são dose dependente e os sinais respiratórios comumente iniciam 2 a 7 dias após a sua exposição, incluindo taquipneia, dispneia, estertor úmido e cianose. A morte pode ocorrer dentro de 8 dias. A lesão pulmonar progressiva pode continuar se desenvolvendo até um período de 7 dias

ou mais, porém, com 21 dias, o prejuízo é mais acentuado observado em animais intoxicados por este herbicida. A maioria dos animais morrem de edema pulmonar, enquanto os outros sobrevivem somente até desenvolverem uma fibrose pulmonar acentuada em 1 semana ou mais (Beasley, 1999, Almeida et al., 2007).

A intoxicação por paraquat em bovinos pode ser notada de 1 a 3 dias após a ingestão. Podem ocorrer como sinais clínicos anorexia, depressão e diarreia, com sinais respiratórios menos frequentes dos observados em cães (Beasley, 1999). Em ovinos intoxicados, os sinais clínicos notados foram depressão, caminhar com cabeça abaixada e com andar incoordenado, perda de apetite, fraqueza, relutância em mover-se, orelhas caídas e pequeno interesse em seu redor. Com menor constância, observaram-se membranas conjuntivais avermelhadas, diarreia aquosa amarela e desidratação (Philbey & Morton, 2001; Almeida et al., 2007).

Histologicamente, em ovinos observou-se congestão pulmonar e um aumento do número de leucócitos polimorfonucleares nos vasos pulmonares, edema intersticial nos pulmões, com hemorragias pulmonares petéquias multifocais e necrose leve nas paredes dos alvéolos. Os hepatócitos apresentavam-se com edema e agregação de leucócitos polimorfonucleares em sinusóides hepáticos. Núcleos nessas áreas foram um pouco excêntrico ou marginalizados. Houve leve necrose dos hepatócitos individuais. Presença de esferóides axonais e placas eosinofílicas na medula oblonga dorsolateral, e vacuolização leve da região do neurópilo no tálamo, mesencéfalo e medula oblonga. Em ambos os ovinos intoxicados houve alterações degenerativas moderadas ao longo da medula espinhal, caracterizado pela formação de câmaras fagocíticas na substância branca e esferóides na massa cinzenta (Philbey & Morton, 2001).

O diagnóstico inclui anamnese apropriada e a observação dos sinais clínicos e lesões. As alterações histológicas também são importantes no diagnóstico e deve ser feita uma análise da fonte de intoxicação. Na maioria dos casos, por causa da rápida excreção do Paraquat, a urina pode ser analisada, sendo esta análise de grande auxílio e maior valor se for realizado nos primeiros 2 dias ou logo após a exposição. Este teste pode confirmar a exposição mesmo antes de ser estabelecido o diagnóstico (Beasley, 1999).

Ainda não existe antídoto ou tratamento efetivo para amenizar os efeitos tóxicos do herbicida (Suntres, 2002). Mesmo assim, o tratamento baseia-se essencialmente em três pontos: prevenção da absorção, rápida excreção do paraquat absorvido e

modificação dos efeitos teciduais do paraquat absorvido e não excretado (Serra et al., 2003).

2.2 Clomazone

Nos últimos anos, um uso intensivo de herbicidas tem levantado preocupação crescente, principalmente por causa da poluição maciça do meio ambiente. Em particular, o glifosato, clomazone, e paraquat estão entre os herbicidas de amplo espectro mais utilizados (Kirmser et al., 2010).

O herbicida Clomazone, com a fórmula (2-(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona), representante da classe isoxazolidinona como ilustra a Figura 1, foi desenvolvido no início de 1980 para o controle de gramíneas anuais e ervas daninhas de folha larga em uma ampla variedade de culturas e localizações (Gunasekara et al., 2009).

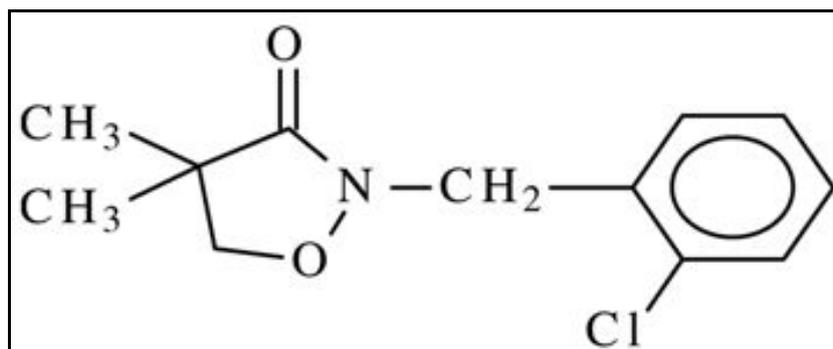


Figura 1- Fórmula do Clomazone (2-(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona). Fonte: Zanella et al., 2000

É um herbicida sistêmico que é absorvido pelas raízes das plantas, inibindo a formação de pigmentos fotossintéticos. Isso resulta em clareamento ou branqueamento de plantas. É geralmente aplicado no início (pré planta, pré-emergente ou planta de pré-incorporados), mas também pode ser aplicado no final do ciclo pós-emergência do algodão e arroz. Normalmente aplicado por equipamento de terra (broadcast ou em faixas), mas também podem ser aplicados via aérea para a cultura do arroz (Sumário clomazone, 2007). A dose de aplicação recomendada pelo fabricante, desse herbicida, nas culturas de arroz irrigado é de 0,4 a 0,7kg/ha (0,4- 0,7mg/L). O valor da CL 50 em

peixes, na espécie jundiá, expostos ao herbicida clomazone foi de 7.32mg/L (Miron, et al. 2004).

Considerado produto perigoso (classe III) ao meio ambiente, não pode ser aplicado de forma aérea em áreas situadas a uma distância mínima de 500 metros de povoação e de mananciais de captação de água para abastecimento público; e de 250 metros de mananciais de água, moradias isoladas, agrupamentos de animais e culturas suscetíveis a danos (Bula do produto¹).

Os efeitos agudos apresentados em animais de laboratório foram DL50 oral para ratos superior a 2.000 mg/kg; DL50 dérmica para ratos: superior a 4.000 mg/kg; CL50 inalatória em ratos: superior a 5,62 mg/L. No entanto, os efeitos crônicos em animais de laboratório analisados em subcrônicos e crônicos, em três diferentes espécies animais, demonstrou que o fígado e alguns parâmetros bioquímicos (ex. aumento dos níveis de colesterol) foram os principais alvos de toxicidade do produto. No estudo de teratogênese em ratos e coelhos, não foram encontradas evidências de malformações, embora no estudo em ratos tenha sido observado atraso no desenvolvimento dos fetos. Também não foram observados efeitos sobre os parâmetros reprodutivos em ratos (Bula do produto¹).

Em humanos e peixes é relatado o aumento nos níveis de estresse nas células sanguíneas, levando a redução dos níveis de eritrócitos e hematócrito com consequente anemia pela intoxicação do herbicida (Crestani et al., 2006; Crestani et al., 2007; Santi et al., 2011; Pereira, 2012)

Segundo Crestani (2007), seu mecanismo de ação para o desenvolvimento da intoxicação em jundiás se assemelha ao dos organofosforados e carbamatos, que são capazes de alterar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), o que resulta no acúmulo do neurotransmissor acetilcolina e excessiva estimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos (Souza et al., 1996; Zachary, 2007).

A atividade da enzima acetilcolinesterase é amplamente utilizada nos estudos da toxicidade provocada por herbicidas e pesticidas em peixes e demais espécies aquáticas. Esta enzima é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina, regulando seus níveis no sistema nervoso central, nas junções neuromusculares e nas sinapses simpáticas. Se ocorrer inibição desta enzima, o neurotransmissor não vai ser

¹ Gamit®- Herbicida Clomazone

hidrolisado, causando uma excessiva estimulação dos nervos colinérgicos (Breteau et al., 2000).

A AChE é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina, regulando seus níveis no sistema nervoso central, nas junções neuromusculares e nas sinapses simpáticas. O acúmulo de acetilcolina induz três tipos de sinais clínicos: (1) muscarínicos, caracterizados por sudorese, sialorreia, hipermotilidade gastrointestinal, diarreia, tenesmo e bradicardia; (2) nicotínicos, resultantes da ação da acetilcolina sobre as placas motoras e caracterizados por rigidez muscular, tremores paresia e paralisia e (3) do sistema nervoso central que resultam em inquietação, ataxia, convulsão, depressão, coma e lesões microscópicas no SNC e SNP (Barros & Driemeier 2007; Gava et al., 2001).

Segundo Crestani (2004), o herbicida clomazone nas concentrações utilizadas na cultura de arroz, causou em peixes a inibição da enzima acetilcolinesterase, tanto no tecido cerebral, como no tecido muscular e vacuolização em hepatócitos .

3 OBJETIVOS

3.1Objetivos Gerais

- Relatar a ocorrência do primeiro surto de intoxicação por clomazone em ovinos no Brasil;
- Descrever os aspectos epidemiológicos, clinicopatológicos, ultraestruturais e toxicológicos da intoxicação natural e experimental por clomazone em ovinos.

3.1Objetivos Específicos

- Reproduzir experimentalmente os achados clinicopatológicos, ultraestruturais e toxicológicos da intoxicação por clomazone em ovinos;
- Estabelecer a dose tóxica de clomazone, administrada por via oral, capaz de causar morte em ovinos;
- Avaliar o potencial residual do clomazone em carne e vísceras de ovinos experimentalmente intoxicados.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo científico. As seções referentes à Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira.

Intoxicação espontânea pelo herbicida clomazone em ovinos e reprodução experimental da doença

Maurício Zacharias Fagundes², Maiara A. Gonçalves³, Mauro Pereira Soares⁴, Manoel Leonardo Martins⁵, Renato Zanella⁵, Franklin Riet-Correa⁶ e Bruno Leite dos Anjos^{3*}

ABSTRACT.- Fagundes M.Z., Gonçalves M.A., Soares M.P., Martins M.L., Zanella R., Riet-Correa F. & Anjos B.L. 2013. [Spontaneous poisoning by herbicide clomazone in sheep and experimental reproduction of the disease]. Intoxicação espontânea pelo herbicida clomazone em ovinos e reprodução experimental da doença. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(0) : 000-000. Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, 97500-970, Uruguaiana, RS, Brasil. E-mail: anjosje@yahoo.com.br

The toxic neuropathies in farm animals caused by pesticides represent an important group of degenerative diseases of the central and peripheral nervous system. However, little is known about the real impact of many of these toxic products on animals and humans and to the environment. The Clomazone is a herbicide that has been widely used in southern Brazil and includes one of the most potent herbicides and supposedly safe, with low toxicity to animals and humans. To date, there are no reports of this herbicide poisoning in domestic animals. This study describes the spontaneous and experimental poisoning due to Clomazone herbicide in sheep. In a flock of 103 sheep, approximately 20 showed clinical signs especially neurological and respiratory. The poisoning was experimentally reproduced in three sheep with the administration of 134mg/kg body weight of Clomazone. Both in natural and experimental cases the clinical signs included tachypnea, anorexia, apathy and limited mobility with weakness in forelimbs and hind limbs, drag tweezers, and gait changes. Macroscopically, there

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal/Patologia Veterinária, Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Uruguaiana, RS, 97500-970, Brasil.

³ Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Uruguaiana, RS, 97500-970, Brasil. *Autor para correspondência: anjosje@yahoo.com.br

⁴ Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.

⁵ Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105-900, Brasil.

⁶ Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, Paraíba, 58700-310, Brasil

were no significant changes. Microscopically, were observed especially vacuolization in the white matter of brain, perineuronal vacuoles and, hyperemia congestion of the leptomeningeal and neuropil vessels. Ultrastructurally, the vacuolar lesions in the brain correspond to dendritic and astrocytic processes swelling. From the data obtained it was concluded that the Clomazone is a toxic agent capable of causing toxic neuropathy in sheep.

INDEX TERMS: diseases of sheep, Clomazone, herbicide, toxic neuropathy, neuropathology.

RESUMO.- As neuropatias tóxicas em animais de produção causadas por pesticidas correspondem a um importante grupo de enfermidades degenerativas do sistema nervoso central e periférico. No entanto, pouco se conhece sobre os reais impactos tóxicos de muitos desses produtos em animais e humanos e ao meio ambiente. O Clomazone é um herbicida amplamente utilizado na região sul do Brasil por ser potente e supostamente seguro, com baixa toxicidade para animais e humanos. Até o presente não há relatos da intoxicação por esse herbicida em animais domésticos. O presente trabalho relata a intoxicação espontânea e experimental por Clomazone em ovinos. De um rebanho com 103 ovinos, 20 animais apresentaram especialmente sinais clínicos neurológicos e respiratórios. A intoxicação foi reproduzida experimentalmente em três ovinos com a administração de 134 mg/kg de peso corporal de Clomazone. Tanto nos casos naturais como experimentais o sinais clínicos incluíram taquipnéia, anorexia, apatia e dificuldade de locomoção com debilidade em membros torácicos e pélvicos, além de arrastar de pinças. Macroscopicamente não foram observadas alterações significativas. Microscopicamente, foram observadas especialmente vacuolização em substância branca e alguns vacúolos perineuronais e congestão de vasos das leptomeninges e do neurópilo. Ultraestruturalmente, as alterações vacuolares caracterizaram-se especialmente por tumefação em dendritos e processos astrocitários. A partir dos dados obtidos conclui-se que o Clomazone é um agente tóxico capaz de causar neuropatia tóxica em ovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: doenças de ovinos, Clomazone, herbicida, neuropatia tóxica, neuropatologia.

INTRODUÇÃO

Doenças do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) correspondem a um importante grupo de enfermidades que acometem animais de produção, principalmente aquelas relacionadas a causas infecciosas e tóxicas, que levam a perdas econômicas impactantes por todo o mundo (Radostits et al. 2002, Summers et al. 1995). No Brasil, inúmeros estudos com base na identificação e controle dessas doenças vêm sendo realizados, especialmente nas espécies bovina e equina. Nas espécies ovina e caprina, embora sejam relatadas inúmeras doenças que acometem o SNC e o SNP, seus reais impactos são pouco conhecidos e muitos ainda são imprecisos na maioria dos estados do país (Guedes 2007, Riet-Correa et al. 2007).

Alguns tipos de neuropatias tóxicas são descritas em pequenos ruminantes no país (Guedes et al. 2007, Grecco et al. 2011). Nos estados do Sul e Sudeste, a ingestão de plantas como *Ateleia glazioviana* “timbó” (na região sul) (Raffi et al. 2006, Stigger et al. 2001), *Tetrapteryx multiglandulosa* (Riet-Correa et al. 2005), *Halimium brasiliense* (Riet-Correa et al. 2009) e plantas que contém swainsonina (Oliveira Junior et al. 2013) são mais detalhadamente relatadas. Já dentre as neuropatias causadas por inseticidas, destacam-se os organofosforados e carbamatos, além dos quadros de intoxicação pelo anti-helmíntico closantel (Ecco et al. 2006, Furlan et al. 2009, Souza et al. 1996). Os relatos de intoxicação por herbicidas em pequenos ruminantes e demais espécies animais no Brasil são escassos, especialmente pela dificuldade de estabelecimento do diagnóstico definitivo.

Atualmente, os herbicidas são a classe de agrotóxicos mais utilizados, correspondendo a 56% do total de formulados químicos comercializados no país. Nos últimos anos, o uso intensivo de herbicidas e pesticidas tem preocupado devido ao seus efeitos deletério sobre organismos não-alvos no meio ambiente, como plantas, animais e o ser humano (Peters 2011). Em virtude da extensa atividade agrícola na região Sul do país, especialmente a arrozícola, o uso de herbicidas como glifosato, paraquat e Clomazone em suas atividades vem sendo intensificado (Kirmser et al. 2010). São descritos no Brasil as intoxicações por glifosato em peixes e humanos (Faria et al. 2009, Gluszczak et al. 2007, Modesto & Martinez 2010) e a intoxicação pelo herbicida paraquat é relatada em humanos, cães, ovinos e bovinos (Philbey & Morton 2001, Serra et al. 2003, Gupta 2012, Santos et al. 2012,).

O herbicida Clomazone (2-(2-clorofenil) metil- 4,4-dimetil- 3-isoxazolidinona) é um representante da classe isoxazolidinona, desenvolvido no início de 1980 para o controle de gramíneas anuais e ervas daninhas de folha larga em uma ampla variedade de culturas, como o arroz, largamente cultivado na fronteira Sul do Rio Grande do Sul (Gunasekara et al. 2009, Crestani, 2007). Nas plantas tem ação sistêmica e é absorvido pelas raízes, inibindo a formação de pigmentos fotossintéticos e consequentemente induzindo à morte. Sua aplicação nas lavouras pode ser realizada por equipamento de terra ou por via aérea para a cultura do arroz (Sumário Clomazone 2007). Até o momento a intoxicação espontânea por Clomazone é relatada apenas em peixes de água doce (Cattaneo et al. 2012, Crestani et al. 2007, Menezes et al. 2011, Moraes et al. 2007, Moraes et al. 2009), e foi reproduzida experimentalmente em peixes e camundongos (Environmental Protection Agency 2007, Miron et al. 2004). Acredita-se que seu potencial tóxico tem como base a ação inibitória da acetilcolinesterase e possa acometer o sistema nervoso de outras espécies animais (Crestani et al. 2007).

Esse trabalho descreve o primeiro surto de intoxicação por Clomazone em ovinos no Brasil e reproduz a intoxicação experimental nessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Epidemiologia e exame clínico

Em um atendimento a propriedade rural, foram coletados dados epidemiológicos e toxicológicos de um rebanho de ovinos da raça Texel, que apresentaram sinais clínicos após exposição acidental decorrente da deriva (desvio da rota do herbicida durante a pulverização) do herbicida Clomazone, nas pastagens e água da propriedade. Todo o rebanho foi avaliado clinicamente e um ovino que apresentou agravamento dos sinais clínicos foi eutanasiado e necropsiado (Ovino 1). Cerca de duas semanas após a exposição do rebanho ao produto os animais foram transferidos para uma área da propriedade livre de contaminação. Quatro semanas após a exposição, um dos ovinos que anteriormente havia apresentado sinais clínicos evidentes, também foi eutanasiado e necropsiado (Ovino 2).

Exame macroscópico e histopatológico

Durante as necropsias, fragmentos de pele, músculo, fígado, rúmex, omaso, abomaso, intestinos delgado e grosso, pâncreas, adrenais, rins, bexiga, pulmões,

linfonodos, osso, baço, olho, nervos do plexo braquial e nervo ciático, bem como o SNC foram coletados fixados em formol a 10%. As amostras foram processadas rotineiramente e coradas pela hematoxilina e eosina (HE). O SNC foi submetido a cortes seriados nas regiões do córtex frontal, córtex parietal, núcleos da base, hipocampo, tálamo, colículos rostrais, ponte, óbex, cerebelo e medula espinhal. Tecidos selecionados foram corados pela técnica de Tricrômico de Masson (TM) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

Exame toxicológico

Amostras de fígado e rim dos ovinos 1 e 2, e músculo desse último, foram coletadas e acondicionadas sob congelamento a -20°C para posterior análise de resíduos do herbicida realizada através de extração pelo método QuEChERS modificado e analisado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) como descrito por Prestes (2011). Amostras de água, solo e vegetação da propriedade foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (GC-MS/MS).

Reprodução experimental

Após obtenção dos resultados epidemiológicos, patológicos e toxicológicos do surto, a reprodução experimental da doença foi realizada em três ovinos clinicamente sadios (ovinos 3, 4 e 5), da raça Texel, fêmeas, com idade média de 8 meses e peso médio de 26 kg. Os ovinos foram mantidos em baia durante o experimento e alimentados com ração comercial para ovino (1% do peso corporal/dia), alfafa e água *ad libitum*. Cada ovino recebeu por via oral 3.500 mg de Clomazone diluído em 100 mL de água, tendo como base a dose tóxica experimental descrita para camundongos (United States Environmental Protection Agency 2007).

Os animais foram submetidos à avaliação clínica diária e avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos (AST, GGT e CK) a partir de coletas sanguíneas na veia jugular, realizadas antes da administração de clomazone, 24h após, 48h após desaparecimento dos sinais clínicos. Os ovinos foram avaliados até o desaparecimento dos sinais neurológicos, sendo então eutanasiados e necropsiados para coleta de fragmentos de diversos órgãos para avaliação histopatológica e ultraestrutural. Amostras do tronco encefálico (tálamo e mesencéfalo) foram coletados e fixados em glutaraldeído a 2% e posteriormente submersas em solução de lavagem, embebidas em

tetróxido de ósmio a 1%, em tampão cacodilato 0.4 M (pH 7,4). As amostras foram desidratadas em etanol e embebidas em Epon 812. Cortes semifinos foram coradas com azul de metileno e secções ultra-finas de áreas selecionadas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e avaliadas por meio de microscópio eletrônico de transmissão (West Germany Zeiss EM 109, operado a 80 kilovolts).

RESULTADOS

Intoxicação espontânea

No mês de novembro de 2011, em uma propriedade do município de Maçambará-RS foi observada acentuada dessecação de toda a pastagem (Fig. 1) causada pela deriva acidental de herbicida aplicado de forma aérea em uma lavoura arrozícola vizinha. A partir dos dados toxicológicos das amostras de solo e vegetação constatou-se a presença exclusiva do herbicida clomazone. De um rebanho de 103 ovinos, 20 ovelhas adultas da raça Texel apresentaram, cerca de 10 dias após a exposição ao herbicida, taquipneia, anorexia, apatia e dificuldade de locomoção com debilidade em membros torácicos e pélvicos, arrastar de pinças com flexão da extremidade distal dos membros e alterações na marcha, semelhante à claudicação (Fig. 2). Na inspeção da área onde os animais pastavam havia um cheiro muito forte do produto, mesmo após 10 dias da exposição ao herbicida. Quatro semanas após exposição ao herbicida notou-se ausência dos sinais clínicos na maioria dos animais afetados.

Na necropsia do Ovino 1 foi observada área focal de hipotricose na região da cabeça (Fig. 3, 4, 5 e 6), consolidação multifocal moderada dos pulmões, fígado levemente amarelado e padrão lobular evidente. O Ovino 2 não apresentou alterações macroscópicas significativas. Microscopicamente, o Ovino 1 apresentou hiperqueratose com descamação do epitélio e leve infiltrado linfoistioplasmocitário perianexal na pele da região das orelhas. Os pulmões apresentaram espessamento moderado de septos interalveolares, com proliferação moderada de fibroblastos e deposição de fibras colágenas, leve proliferação de pneumócitos, especialmente os do tipo II (Fig.7 e 8) e áreas de enfisema e edema pulmonar com hipertrofia moderada de músculos bronquiais. No fígado havia vacuolização difusa moderada de hepatócitos, especialmente em áreas periportais e mediozonais, além de raros hepatócitos necróticos e raros neutrófilos em vasos periportais e centrolobulares (Fig. 9). O baço apresentou moderada hemossiderose e infiltrado neutrofilico circundando a polpa branca. Nos rins observou-se congestão

difusa moderada e raros cilindros hialinos na luz de túbulos, especialmente na região medular (Fig. 10). Em seções do encéfalo foi observada vacuolização em áreas de substância branca e congestão acentuada em vasos das leptomeninges e do neurópilo (Fig. 11 e 12). Além disso, um discreto infiltrado inflamatório misto foi observado na região perivascular em algumas regiões (Fig.13), edema perivascular discreto e vacuolização perineuronal próximo às células de Purkinje no cerebelo (Fig. 14). No ovino 2 alterações semelhantes foram observadas (Fig.15 e 16), porém, em menor intensidade, além dessas, notou-se leve quantidade de pigmento dourado granular no citoplasma de neurônios compatível com o lipofuscina. Não foram observadas alterações histológicas nos demais órgãos de ambos os ovinos.

Na análise de resíduos de pesticidas, foi detectado resíduos do Clomazone em amostras de fígado e rim dos ovinos 1 e 2 e no músculo, avaliado somente no Ovino 2.

Intoxicação experimental

Experimentalmente, dois dias após a administração do Clomazone, iniciaram os sinais clínicos neurológicos no Ovino 3. O animal apresentou debilidade visível dos membros pélvicos e torácicos, dificuldade de se manter em estação, cruzando os membros até a queda, tremores musculares, posição de cavalete, quedas frequentes e acentuada dispneia. Períodos breves de decúbito (aproximadamente 20 minutos) eram intercalados com o retorno da posição quadrupedal. Quando estimulado à caminhar o ovino apresentava o retorno dos sinais clínicos. Quatro dias após administração do herbicida notou-se ausência total dos sinais clínicos. O Ovino 4 não apresentou alterações clínicas e morreu 24h após a administração do herbicida. O Ovino 5 apresentou 10h após administração do Clomazone, debilidade nos membros pélvicos e queda quando submetido a movimentação, decúbito, midríase permanente, tremores musculares com espasmos nos membros pélvicos e torácicos e evolução para morte em 24h (Quadro 1).

A avaliação hematológica e bioquímica do Ovino 3 demonstrou inicialmente discreta redução das concentrações de eritrócitos (7 μ L - Microlitros) e do hematócrito (22%). No período de 48h após o desaparecimento dos sinais clínicos a concentração de eritrócitos reduziu ainda mais (6,3 μ L). Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos. Os parâmetros hematológicos do Ovino 4 não alteraram, somente os parâmetros bioquímicos demonstraram ligeiro aumento da enzima AST (119.5 UI/L) 24h após a administração de Clomazone. O Ovino 5 apresentou redução

significativa da concentração de eritrócitos imediatamente após administração de Clomazone e 24h após correspondente a $4,2/\mu\text{L}$ e hematócrito em 21%, e discreto aumento de AST (97,5 UI/L). Após este período nenhuma alteração foi observada. Os parâmetros hematológicos podem ser melhor observados no Quadro 2.

Na necropsia dos Ovinos 3, 4 e 5 não foram observadas alterações significativas. Microscopicamente, em todos os ovinos intoxicados experimentalmente, as alterações concentraram-se principalmente no SNC. Foi observada congestão em vasos do neurópilo nos três ovinos, hemorragia discreta no espaço de Virchow-Robin de alguns vasos com tumefação discreta de células endoteliais no ovino 3 (Fig. 17), associado a discreto edema perivascular, além disso, vacuolização na substância branca em algumas regiões. O Ovino 4 não apresentou alterações microscópicas significativas. No Ovino 5 igualmente observou-se vacuolização em substância branca, principalmente na região do córtex parietal, e vacuolização perineuronal (Fig. 18). Hemorragia perivascular, edema e tumefação endotelial também foram vistas neste ovino (Fig. 19). O Ovino 3 apresentou pulmões com áreas multifocais de congestão, também observada nos demais ovinos, e edema alveolar moderado. No baço, somente no Ovino 5, observou-se congestão difusa e leve infiltrado neutrofílico em meio a polpa vermelha. No rim do Ovino 3 e 5 observaram-se congestão moderada, principalmente na região medular do órgão, moderada quantidade de cilindros hialinos e granulares na luz de túbulos da região cortical e moderada quantidade de neutrófilos em glomérulos. Necrose tubular com desnudamento de alguns túbulos também foi observada. As alterações renais foram mais significativas no Ovino 5 (Fig. 20). Os achados microscópicos e sua distribuição no SNC dos ovinos podem ser mais bem visualizados no Quadro 3.

Ultraestruturalmente, foram observados especialmente no tálamo e mesencéfalo acentuada tumefação de astrócitos, dos seus processos, bem como de dendritos neuronais (Fig. 21 e 22). Nessas localizações os axônios mostravam-se tumefeitos com dispersão dos microtúbulos no axoplasma (Fig.23), tumefação das mitocôndrias com ruptura das membranas mitocondriais e lise das cristas. Em algumas mitocôndrias foi encontrado no seu interior restos de membranas e matriz eletrodensa. Os neurônios mostravam dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias exibiam lise das cristas (Fig. 24 e 25). Os hepatócitos apresentavam mitocôndrias tumefeitas com desorganização e lise das cristas, gotas lipídicas de diferentes tamanhos e alguns vacúolos delimitados por membrana e com conteúdo granular (Fig. 26).

DISCUSSÃO

O diagnóstico de doença neurológica associada à intoxicação pelo herbicida Clomazone nos ovinos foi baseado nos aspectos epidemiológicos, clinicopatológicos e toxicológicos observados no surto e o estudo experimental permitiu uma melhor caracterização do quadro tóxico. A visita técnica à propriedade foi crucial para a obtenção do diagnóstico, tanto por reforçar a suspeita de intoxicação baseado no forte odor de agrotóxico na propriedade, como pela possibilidade de coleta de amostras de solo, vegetais e água na propriedade, juntamente com amostras de tecidos dos ovinos, o que permitiu a identificação do Clomazone.

Segundo Gupta (2012), todo herbicida requer condições específicas de utilização e erros na aplicação sejam talvez a principal causa de intoxicação em humanos e animais. Neste caso, a exposição dos ovinos ao Clomazone ocorreu devido a deriva acidental do produto por aplicação aérea. De acordo com a análise toxicológica de determinação do Clomazone, os resíduos podem durar até 130 dias na água e já foram detectados em 90% de amostras de água recolhidas de rios em regiões de cultivo de arroz (Zanella et al. 2002). Esta afirmação indica que mesmo após o início da regressão dos sinais clínicos observados nos animais expostos espontaneamente ao produto (uma semana após o surto), os ovinos ainda permaneciam em contato com o herbicida até serem retirados do local acometido.

Os ovinos intoxicados experimentalmente, com exceção do Ovino 4 que morreu agudamente, apresentaram sinais clínicos semelhantes aos observados nos ovinos do surto, caracterizados por intensa dispneia, seguida de alterações motoras significativas. Acredita-se que a ausência de sinais clínicos um mês após exposição ao produto no Ovino 2 (surto), possa estar relacionado com a metabolização do princípio tóxico no organismo. Da mesma forma, isso pode ter ocorrido no Ovino 3 (experimental). É importante ressaltar que a dose utilizada na indução experimental da doença foi estimada com base na dose tóxica para camundongos por ingestão oral (United States Environmental Protection Agency 2007), tida como importante via de contaminação nos ovinos do surto.

Acredita-se que os sinais clínicos observados imediatamente após a exposição ao herbicida na doença espontânea e no Ovino 3, intoxicado experimentalmente, e seu completo desaparecimento, possui relação direta com a atividade da acetilcolinesterase no SNC. Em estudo com peixes expostos ao Clomazone, foi relatada uma significativa

redução da enzima acetilcolinesterase, e recuperação de sua atividade em 92 a 194h após a exposição (Crestani et al. 2007). Experimentos realizados com peixes expostos ao herbicida propõem a inibição da enzima acetilcolinesterase tanto no tecido cerebral, como no tecido muscular (Crestani et al. 2007, Cattaneo et al. 2012). Alterações semelhantes são descritas em casos de intoxicação por organofosforados e carbamatos em ruminantes com acometimento do sistema nervoso central e indução de lesões degenerativas (Barros & Driemeier 2007, Dalto et al. 2011).

No Ovino 3 os sinais clínicos se intensificavam quando o animal era submetido ao movimento, também demonstrado na intoxicação por *H. brasiliense*, devido a degeneração axonal (Riet-Correa et al. 2009). Intoxicações por plantas que contêm swainsonina também podem causar sinais clínicos semelhantes aos observados na intoxicação por Clomazone (Oliveira Junior et al. 2013). Na intoxicação por organofosforados e carbamatos na espécie ovina e bovina (Barros & Driemeier 2007, Barros et al. 2006) são relatados sinais clínicos muscarínicos, caracterizados por alterações cardio-respiratórias, que progridem para sinais nicotínicos como paralisia flácida, opistótono, tremores e fraqueza muscular (Osweiler 1998, Radostits et al. 2002). Na doença espontânea e experimental em estudo, os animais apresentaram sinais clínicos respiratórios, especialmente taquipneia, seguido por sinais neurológicos com tremores musculares, debilidade motora e aparente déficit proprioceptivo, este último, mais acentuado no Ovino 3. Entretanto, os sinais respiratórios no caso do Clomazone, não parecem estar relacionados com alterações muscarínicas, e sim, lesão direta do princípio tóxico, observada nos pulmões.

As alterações patológicas dos ovinos do surto foram mais significativas no pulmão e SNC, compatível com os sinais clínicos respiratórios e neurológicos apresentados. Ambos apresentaram alterações caracterizadas por pneumonia intersticial, o que contribuiu com os sinais clínicos respiratórios acentuados e apontam para uma ação tóxica pulmonar do clomazone em ovinos, além de incluir o sistema respiratório como uma importante via de inoculação do Clomazone, semelhante ao que é descrito para o herbicida paraquat (Serra et al. 2003). As formas da intoxicação pelo Clomazone em mamíferos ainda não foram definidas, entretanto, nas recomendações feitas pelo fabricante são descritas as intoxicações por ingestão, por via respiratória e cutânea. Essas formas são semelhantes às que ocorrem na intoxicação pelo herbicida paraquat, especialmente a forma respiratória (Serra et al. 2003, Schmitt et al. 2006).

A degeneração hepática observada microscopicamente e ultraestruturalmente no Ovino 1 pode estar relacionada com a ação direta do produto em hepatócitos, semelhante às lesões descritas por Crestani et al. (2007) em fígados de peixes intoxicados por Clomazone. No entanto, a diminuição da ingestão de alimento pode ter contribuído para o estabelecimento desta alteração.

As lesões no sistema nervoso central apresentadas pelos Ovinos 1 e 2 foram discretas e observadas predominantemente na substância branca do tronco encefálico. Em várias áreas avaliadas as alterações caracterizaram-se por vacúolos perineuronais, também observados nos Ovinos 3 e 5 (casos experimentais), confirmados ultraestruturalmente como tumefação de dendritos. Alterações dendríticas são descritas em casos de intoxicação por *Ipomoea asarifolia*, nos quais são demonstrado tumefação focal de dendritos de células de Purkinje, dilatação do retículo endoplasmático liso e inclusões granulares eletro densas.

Essas alterações resultam clinicamente em tremores musculares de membros e cabeça, distúrbios na marcha com hipermetria, ataxia, membros em base ampla e decúbito por longos períodos. Quando os animais são movimentados ou assustados a incoordenação agravava-se. Na intoxicação por *I. asarifolia*, ocorre recuperação gradual dos sinais clínicos (Araújo et al. 2008), como observado nos ovinos intoxicados por Clomazone. De acordo com Ikegaya et al. (2001), a tumefação dendrítica aguda e perda de espículas é uma característica patológica de ativação excessiva de receptores do glutamato ou excitotoxicidade, e foram consideradas como um mecanismo de defesa neuronal

Além das lesões degenerativas observadas, cabe salientar que a intensa congestão observada na maioria das regiões avaliadas no SNC de todos os animais afetados por Clomazone (doença espontânea e experimental), e por vezes, associada a discreta hemorragia e edema com tumefação de células endoteliais pode estar relacionada a alterações vasculares induzidas diretamente pelo princípio tóxico. A lipofuscinoses observada em neurônios de Purkinje do cerebelo do Ovino 2 pode ser decorrente de acúmulo de organelas lesionadas, devido a lesão neuronal prévia como demonstrado (Riet-Correa et al. 2009). Cabe ressaltar que este foi o único animal avaliado que foi exposto a um maior período de contato com o herbicida, desenvolveu sinais clínicos e apresentou regressão dos mesmos um mês após.

Nos Ovinos do surto (1 e 2) a exposição ao Clomazone foi mais prolongada que nos ovinos experimentais e este fato provavelmente resultou na formação de lesões mais

significativas no SNC, enquanto os Ovinos 3 e 5 desenvolveram alterações patológicas mais brandas, no entanto, semelhantes as observadas na doença espontânea, com sinais clínicos neurológicos mais evidentes. Essas variações podem estar relacionadas com a dose tóxica ingerida nos diferentes grupos e a via de contaminação do princípio tóxico.

As alterações ulcerativas com hipotríquia na pele observadas podem ter decorrido de absorção do produto via cutânea, como também observado em outros herbicidas como o paraquat, causando lesão epitelial, decorrente da absorção cutânea (Serra et al. 2003).

A via de eliminação dos metabólitos do princípio tóxico do Clomazone não é descrita. No entanto, nos ovinos intoxicados, supõe-se que uma das vias de eliminação seja a via renal, e essa passagem seja responsável pela lesão tubular tóxica observada, especialmente no Ovino 5.

Alterações hematológicas promovidas por Clomazone são descritas em humanos e peixes intoxicados pelo herbicida. Há nessas espécies redução dos níveis de eritrócitos e hematócrito com conseqüente anemia devido a considerável elevação nos níveis de estresse oxidativo ocasionando lesões nessas células (Crestani et al. 2006, Crestani et al. 2007, Santi et al. 2011, Pereira, 2012). Achados hematológicos semelhantes foram observados em alguns dos ovinos intoxicados experimentalmente pelo clomazone. A degeneração gordurosa no fígado do Ovino 1, explica a elevação da enzima AST, que foi igualmente vista em peixes expostos ao Clomazone (Crestani et al. 2007), havendo redução significativa da lesão após a remoção dos peixes da água contendo o produto.

A avaliação toxicológica de amostras de fígado e músculo dos ovinos 1 e 2, respectivamente, demonstraram que o princípio tóxico identificado nas amostras de ambos foi o mesmo identificado nas amostras de água, solo e vegetal coletados no momento do surto da doença na propriedade. Considerando a área dos picos cromatográficos, o resíduo de Clomazone foi observado nas amostras coletadas dos dois ovinos do surto. A amostra de tecido muscular do ovino 2 apresentou o resultado elevado (1.142 unidades de área), indicando uma concentração ainda elevada de Clomazone neste tecido o que pode indicar restrições quando ao consumo da carne de animais expostos que apresentaram sinais clínicos e se recuperaram, mesmo 30 dias após o contaminação.

Considerando os aspectos clinicopatológicos observados na doença espontânea e na intoxicação experimental por Clomazone foi possível estabelecer que o herbicida promove neuropatia com alterações dendríticas que culminam em sinais clínicos

motores, bem como, induz lesões pulmonares com alterações respiratórias significativas. É importante diferenciar a intoxicação por Clomazone de outras distúrbios neurotóxicos.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor. À empresa Topographia e Planejamento Rural S/S Ltda pela colaboração na coleta de dados epidemiológicos e toxicológicos.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unipampa sob protocolo N° 009/2012.

REFERÊNCIAS

- Araújo J.A.S., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T. , Soares, M.P., Oliveira, D.M. & Carvalho, F.K.L. 2008. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28:488-494.
- Barros C.S.L., Driemeier D, Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. Coleção Vallé, São Paulo, 207p.
- Barros C.S.L. & Driemeier D. 2007. Intoxicação por organofosforados e carbamatos, p.80-85. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.2. Pallotti Gráfica e Editora, Santa Maria, RS.
- Cattaneo R., Moraes B.S., Loro V. L.P.A., Menezes C., Sartori G.M.S., Clasen B., Avila L.A., Marchesan E. & Zanella R. 2012. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62:97–106.
- Crestani M., Menezes C., Gluszczak L., Miron D.S., Lazzari R., Duarte M.F., Morsch V.M., Pippi A.L. & Vieira V.P. 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 65:48–55.

- Crestani M., Menezes C., Glusczak L., Miron D.S., Spanevell, R., Silveira A., Gonçalves F.F., Zanella R. & Loro V.L. 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*. 67:2305–2311.
- United States Environmental Protection Agency. 2007. Clomazone Summary Document: Registration Review Environmental. Washington.
- Dalto A.G.C., Albornoz L., Gonzalez P.C.S., Bitencourt A.P.G., Gomes D.C., Pedroso P.M.O. & Bandarra P.M. 2011. Intoxicação por organofosforados em bezerras no Uruguai. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39:1-4.
- Ecco R., Barros C.S.L., Graça D.L. & Gava A. 2006. Closantel toxicosis in kid goats. *Vet. Rec.* 159(17): 564-566.
- Faria N.M.X., Rosa J.A.R. & Facchini L.A. 2009. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura. *Ver. Saúde Pública*. 43:335-44.
- Furlan F.H., Luciola J., Borelli V., Fontequ J.H., Stolf L., Traverso S.D. & Gava A. 2009. Intoxicação por closantel em ovinos e caprinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet.Bras.* 29:89-93.
- Glusczak L., Miron S.D., Silveira M.B., Rodrigues S.R., Schetinger M.R.C., Morsch V.M. & Loro V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146:519–524.
- Grecco F.B., Estima-Silva P., Marcolongo-Pereira C., Soares M.P., Collares G. & Schild. A.L. 2011. Seneciose crônica em ovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 31:326-330.
- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Miranda Neto E.G., Nobre V.M.T., Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* 27:29-38.
- Gupta P.K. 2012. Toxicity of herbicides, p.631-652. In: Gupta R.C. *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. 2th Ed. Elsevier, California.
- Ikegaya Y., Kim J.A., Baba M., Iwatsubo T., Nishiyama N. & Atsuki N. 2001. Rapid and reversible changes in dendrite morphology and synaptic efficacy following NMDA receptor activation: implication for a cellular defense against excitotoxicity. *J. Cell Sci.* 114:4083-4093.

- Kirmser E.M.D., Mártire D.O., Gonzalez M.C. & Rosso J.A. 2010. Degradation of the herbicides clomazone, paraquat, and glyphosate by thermally activated peroxydisulfate. *J. Agric. Food Chem.* 58:12858–12862.
- Menezes C.C., Loro V.L., Fonseca M.B., Cattaneo R.P.A., Miron D.S. & Santi A. 2011. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pest. Biochem. and Phys.* 100:145–150.
- Modesto K.A. & Martinez C.B.R. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 78:294–299.
- Moraes B.S., Loro V.L., Gluszczak L., Pretto A., Menezes C., Marchezan E. & Machado S.O. 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere.* 68:1597–1601.
- Moraes B.S., Loro V.L., Pretto A., Fonseca M.B., Menezes C., Marchesan E., Reimche G.B. & Avila L.A. 2009. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pest. Biochem. and Phys.* 95:57–62.
- Oliveira Júnior C.A., Riet-Correa G. & Riet-Correa F. 2013. Intoxicação por plantas que contêm swainsonina no Brasil. *Ciência Rural.* 43:653-661.
- Osweiler G. D. 1998. Inseticidas e Moluscidas, p.259-282. In: ___ (Ed.), *Toxicologia Veterinária*. Artes Médicas, Porto Alegre, RS.
- Pereira L. 2012. Efeitos dos herbicidas clomazone e ametrina em parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Tese de doutorado em Ciências-Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 100p.
- Peters L.P. 2011. Efeito do herbicidas ametrina e clomazoneno sistema antioxidante bacteriano. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Philbey A.W. & Morton A.G. 2001. Paraquat poisoning in sheep from contaminated water. *Aust. Vet. Jour.* 79:842-843.
- Prestes O.D. 2011. Método rápido para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 130p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K. W. 2002. Compostos organofosforados e carbamatos (organofosfatos), p.1456-1459. In: ___ (9Ed.), *Clínica Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- Raffi M.B., Rech R.R., Sallis E.S.V., Barros S.S. & Barros C.S.L. 2006. Chronic cardiomyopathy and cerebral spongy changes in sheep experimentally fed *Ateleia glazioviana*. *Ciência Rural*. 36:1860-1866.
- Riet-Correa F., Barros S.S., Méndez M.C., Gevehr-Fernandes C., Pereira Neto O.A., Soares M.P. & McGavin M.D. 2009. Axonal degeneration in sheep caused by the ingestion of *Halimium brasiliense*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:478-486.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borge J.R.J. 2007. Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. Vol.2. Pallotti Gráfica e Editora, Santa Maria, 694p.
- Riet-Correa G. Terra F.F., Schild A.L., Riet-Correa F. & Barros S.S. 2005. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (*Malphigiaceae*) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 25:91-96.
- Santi A., Menezes C., Duarte M.M.F., Leitemperger J., Lopes T. & Loro V.L. 2011. Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (*in vitro*). *Interdiscip Toxicol.* 4:149-153.
- Santos A., Maia F., Coutinho M. & Rodrigues A.L. 2012. Aspectos gerais da intoxicação por paraquat em animais domésticos. *Revista Lusófona De Ciência e Medicina Veterinária*. 5:43-55.
- Santos D.V., Azambuja R.M. & Vidor A.C. 2009. Dados populacionais do rebanho ovino gaúcho. Secretária da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Rio Grande do Sul (SEAPPA), RS.
- Schmitt G.C., Paniz C., Grotto D., Valentini J., Schott K.L., Pomblum V.J. & Garcia S.C. 2006. Aspectos gerais e diagnóstico clínico laboratorial da intoxicação por paraquat. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42:235-243.
- Serra A., Domingos F. & Prata M.M. 2003. Intoxicação Por Paraquat. *Acta Médica Portuguesa*. 16:25-32.
- Souza M.V., Graça D.L. & Cervo D. 1996. Neurotoxicidade tardia experimentalmente induzida por haloxon em ovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48:275-286.
- Stigger A.L., Barros C.S.L., Langohr I.M. & Barros S.S. 2001. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (*Leg. Papilionoideae*) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 21:98-108.
- Summers B.A., Cummings J.F. & De Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology*. Mosby Year Books, St Louis, Missouri. 527p.
- Zanella R., Primel E.G., Machado S.L.O., Goncalves F.F. & Marchezan E. 2002. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-

phase extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatography*. 55:573–577.

Quadro 1. Doses administradas, sinais clínicos e evolução da intoxicação espontânea e experimental por clomazone em ovinos.

Ovino	Dose única de clomazone	Sinais clínicos	Início dos sinais clínicos	Desfecho
Ovino 1	I/N ^a	Taquipneia, anorexia, apatia, dificuldade de locomoção com debilidade em membros torácicos e pélvicos, arrastar de pinças com flexão da extremidade distal dos membros	Poucas horas após a exposição ao herbicida	Eutanásia poucas horas após a exposição ao herbicida
Ovino 2	I/N ^a	Semelhante ao Ovino 1	Poucas horas após a exposição ao herbicida	Ausência total dos sinais clínicos em 4 semanas após a exposição ao herbicida e eutanásia
Ovino 3	3.500mg	Taquipneia, debilidade dos membros pélvicos, queda e tremores musculares	Dois dias após administração do herbicida	Ausência total dos sinais clínicos 4 dias após administração do herbicida e eutanásia
Ovino 4	3.500mg	Ausência de sinais clínicos	Ausência de sinais clínicos	Morte aguda 18h após administração do herbicida
Ovino 5	3.500mg	Taquipneia, debilidade dos membros pélvicos, quedas e decúbito prolongado, midríase permanente, tremores musculares com espasmos nos membros pélvicos e torácicos	Dez horas após administração do herbicida	Morte com 30h após administração do herbicida

^aOvinos intoxicados naturalmente por clomazone.

Quadro 2. Valores hematológicos de ovinos intoxicados experimentalmente por clomazone em diferentes períodos da intoxicação.

Ovino	Análise	Hemograma										
		Eritrograma						Leucograma				
		Erit ^a	Hb ^b	Ht ^c	VCM ^d	CHCM ^e	PPT ^f	Leu ^g	Neu ^h	Linf ⁱ	Mon ^j	Eos ^k
Ovino 3	Antes da administração	9.9	10.0	30	30.3	33.3	6.8	4.800	2.736	2.016	48	–
Ovino 3	24h após administração	7.0	7.3	22	31.4	31.1	6.0	7.700	4.851	2.618	231	–
Ovino 3	48h após desaparecimento dos sinais clínicos	6.3	7.0	23	36.5	30.4	5.6	4.400	1.452	2.904	220	44
Ovino 4	Antes da administração	9.0	9.0	27	27.2	33.3	6.2	4.800	1.920	2.688	96	96
Ovino 4	18h após administração	10.5	9.0	28	26.6	32.1	6.8	6.900	4.485	1.794	414	–
Ovino 5	Antes da administração	6.0	8.0	25	41.6	32.0	5.6	5.300	1.219	3.604	159	265
Ovino 5	24h após administração	4.2	7.0	21	50.0	33.3	5.4	6.400	4.160	1.792	64	–
Valores de referência		8.0-11.0	8.0-13.0	27-46	23-48	33.3	6.0-7.5	4.000-10.000	700-6.000	2.000-9.000	0-750	0-1.000

^aEritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$), ^bhemoglobina(g/dl), ^chematócrito (%), ^dvolume corpuscular médio (fentolitros), ^econcentração de hemoglobina corpuscular média (%), ^fproteínas totais (g/dl), ^gleucócitos (/mm³), ^hneutrófilos (/mm³), ⁱlinfócitos (/mm³), ^jmonócitos; ^keosinófilos (/mm³)

Quadro 3. Distribuição e intensidade das lesões observadas no sistema nervoso central de ovinos intoxicados naturalmente e experimentalmente pelo herbicida clomazone

Regiões do SNC	Ovino				
	Ovino 1	Ovino 2	Ovino 3	Ovino 4	Ovino 5
Córtex frontal	Vacuolização multifocal + a +++ na substância branca, congestão + + a +++ em vasos do neurópilo e leptomeninges, infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário misto multifocal + nas leptomeninges e neurópilo.	Vacuolização multifocal + a + na substância branca, infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário multifocal nas leptomeninges e neurópilo ++, congestão difusa + em vasos do neurópilo.	Congestão difusa ++ a +++ em vasos do neurópilo, hemorragia perivascular + no neurópilo, tumefação multifocal + em células endoteliais.	Congestão difusa ++ em vasos do neurópilo.	Congestão difusa ++ no neurópilo.
Núcleos da base	Infiltrado inflamatório + misto perivascular multifocal em leptomeninges e neurópilo.	Vacuolização multifocal + a ++, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal ++, congestão difusa + vasos neurópilo.	Congestão difusa ++ a +++ vasos neurópilo, astrogliose + multifocal.	Congestão difusa ++ vasos neurópilo.	Vacuolização substância branca difusa +, vacuolização perineuronal +.
Córtex parietal	Vacuolização multifocal + a +++ substância branca, congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges	Vacuolização multifocal + a ++, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal ++, congestão difusa + vasos neurópilo.	Congestão difusa ++ a +++ vasos neurópilo.	Congestão difusa + vasos neurópilo.	Vacuolização substância branca difusa +, hemorragia perivascular ++ neurópilo, tumefação + células endoteliais, congestão difusa +++ neurópilo.
Hipocampo	Congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges, edema perivascular + a +++.	Vacuolização multifocal + a ++, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal ++, congestão difusa + vasos neurópilo.	Congestão difusa ++ a +++ vasos neurópilo.	Congestão difusa ++ vasos neurópilo.	s/a
Tálamo	Congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges.	Vacuolização multifocal + a ++.	s/a	s/a	Vacuolização em substância branca + e congestão difusa ++.

+ Discreto; ++ Leve; +++ Moderado; s/a sem alterações.

Continuação do Quadro 3					
	Ovino 1	Ovino 2	Ovino 3	Ovino 4	Ovino 5
Mesencéfalo	Congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges; infiltrado inflamatório + misto perivascular multifocal em leptomeninges e neurópilo.	Vacuolização multifocal + a ++	Congestão difusa ++ a +++ vasos neurópilo.	s/a	Vacuolização multifocal + substância branca.
Ponte	Congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges	Vacuolização multifocal + a ++	s/a	s/a	s/a
Pedúnculos cerebelares	s/a	Pigmento dourado granular + no citoplasma de neurônios (lipofuscina).	Vacuolização + de substância branca; congestão difusa ++ a +++ vasos neurópilo; tumefação + células endoteliais; hemorragia perivascular +; edema perivascular multifocal +.	s/a	Congestão difusa + neurópilo.
Óbex	Congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges; discretos esferóides axonais.	Pigmento dourado granular + no citoplasma de neurônios (lipofuscina).	Congestão difusa ++ a +++ vasos neurópilo.	s/a	Vacuolização em substância branca +.
Cerebelo	Vacuolização multifocal +++ perineuronal próxima células de Purkinge; área focal de astrogliose no neurópilo.	Vacuolização multifocal + a ++.	s/a	s/a	Vacuolização multifocal ++ substância branca; congestão difusa ++.
Medula espinhal	Congestão ++ a +++ vasos do neurópilo e leptomeninges (cervical).	Pigmento dourado granular ++ no citoplasma de neurônios (lipofuscina) (medula cervical).	Congestão difusa + a ++ vasos neurópilo.	s/a	Congestão multifocal ++; edema e hemorragia perivascular multifocal +.

+ Discreto; ++ Leve; +++ Moderado; s/a sem alterações.



Fig.1. Área da propriedade com pastagem dessecada após contato com deriva de clomazone administrado por via aérea.



Fig.2. Ovino 1. Observa-se membro torácico direito com debilidade e articulação cárpica flexionada com arrastar das pinças.



Fig.3. Ovelha do surto com acentuada perda da lã na região da cabeça e crostas brancacentas nas orelhas.



Fig.4. Ovino 1 intoxicado naturalmente por Clomazone com perda da lã, pelos e pequenas feridas com crosta na região periocular direita.



Fig. 5. Cordeiro exposto naturalmente ao clomazone com perda dos pelos da orelha e crostas brancacentas nas orelhas.



Fig.6. Cordeiro exposto naturalmente ao clomazone com perda dos pelos da orelha e crostas brancacentas nas orelhas, imagem mais próxima.

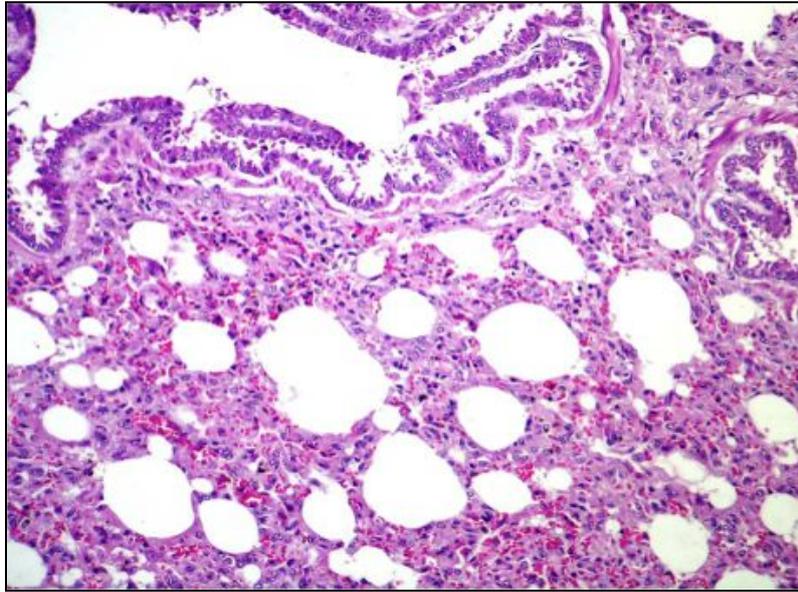


Fig.7. Ovino 1. Seção do pulmão com moderada proliferação de tecido conjuntivo com espessamento dos septos interalveolares, proliferação de pneumócitos I e congestão. HE, Obj. 10X.

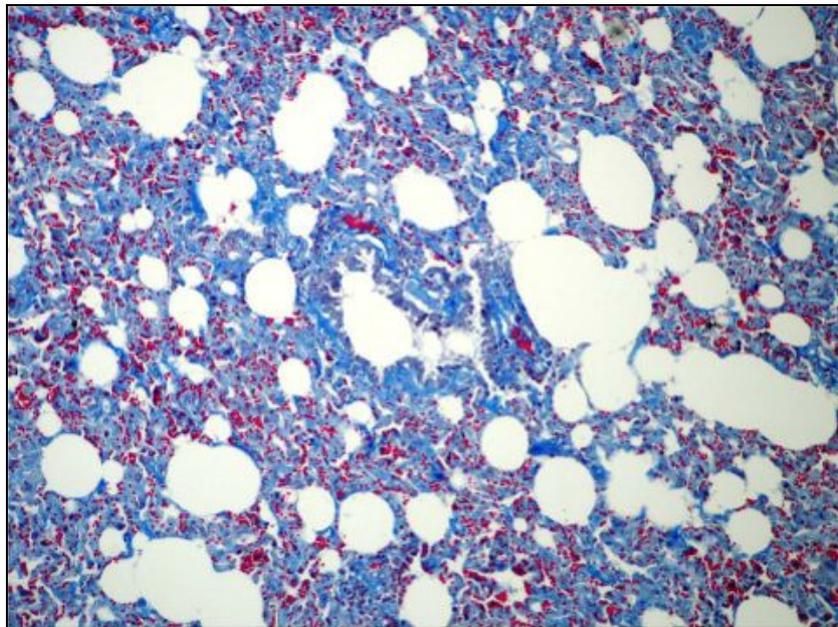


Fig.8. Ovino 1. Observa-se uma seção do pulmão com moderada proliferação de tecido conjuntivo corado em azul e espessamento dos septos interalveolares. Tricrômico de Masson, Obj. 10X.

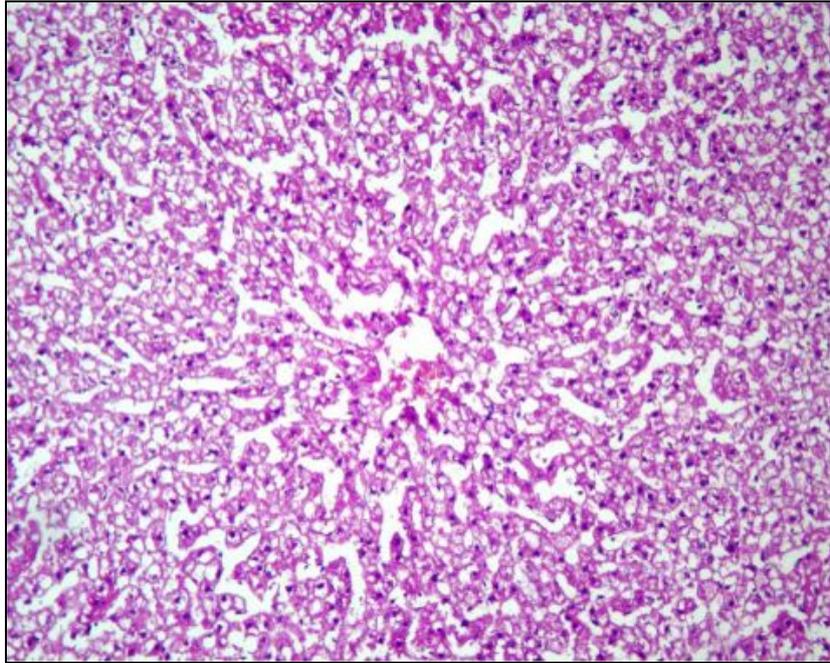


Fig.9. Fígado. Pode ser observada leve vacuolização de hepatócitos da região centrolobular. HE, 10X.

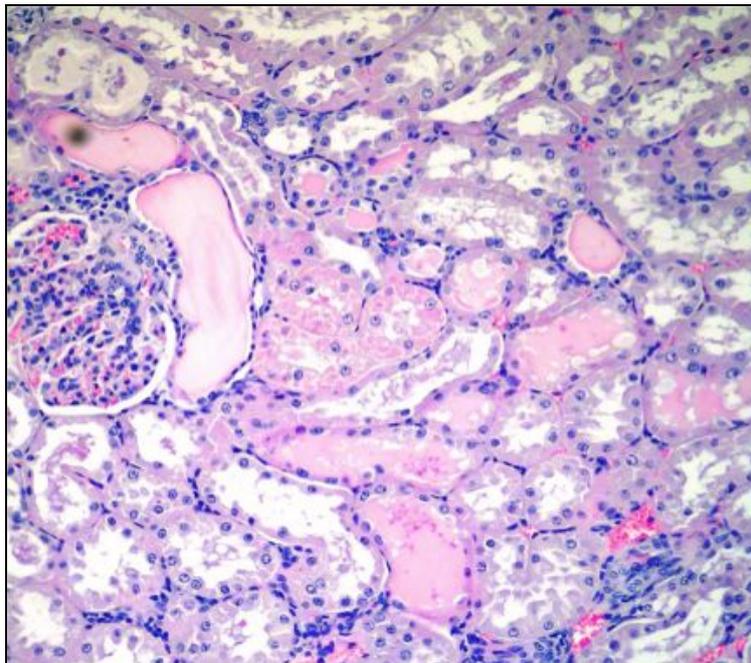


Fig. 10. Ovino 1. Rim. Cilindros hialinos na luz de túbulos contorcidos.

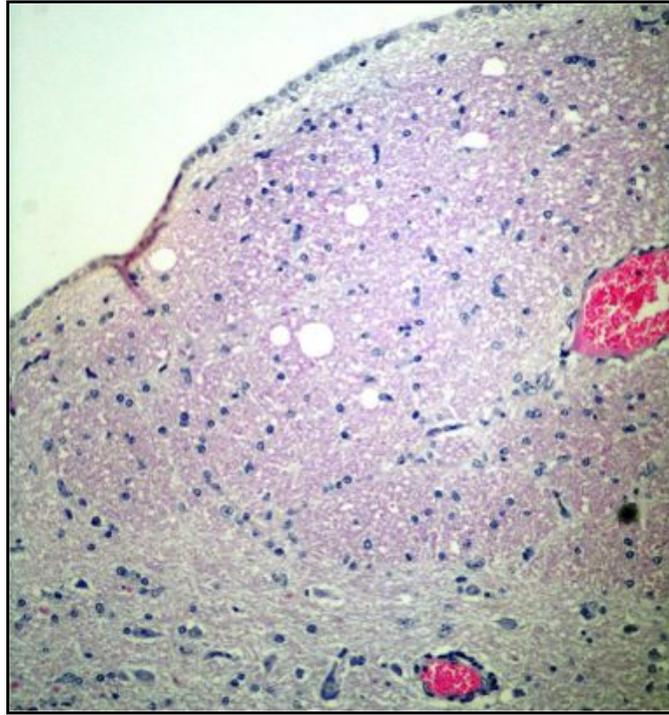


Fig. 11. Ovino 1. Encéfalo. Tálamo. A seção apresenta vacúolos na substância branca e congestão acentuada de vasos do neurópilo. HE, 10X.

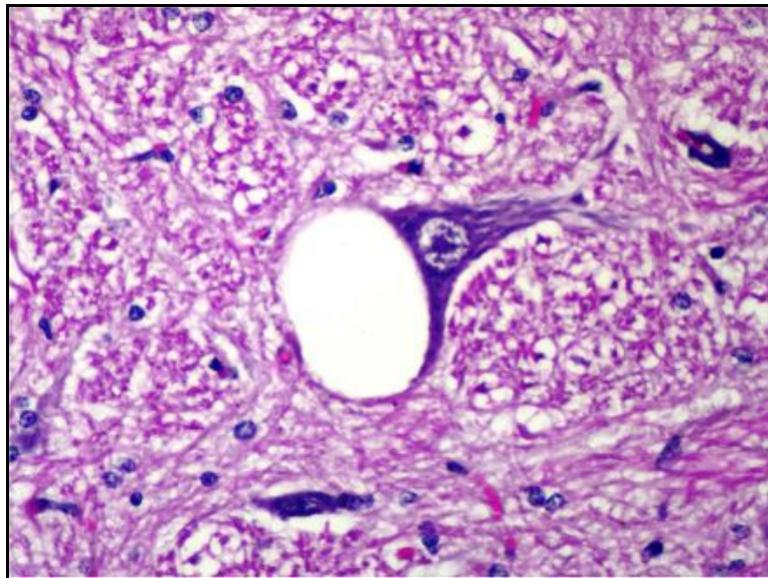


Fig. 12. Ovino 1. Encéfalo. Óbex. Grande vacúolo perineuronal que comprime o pericario neuronal. HE, 40X.

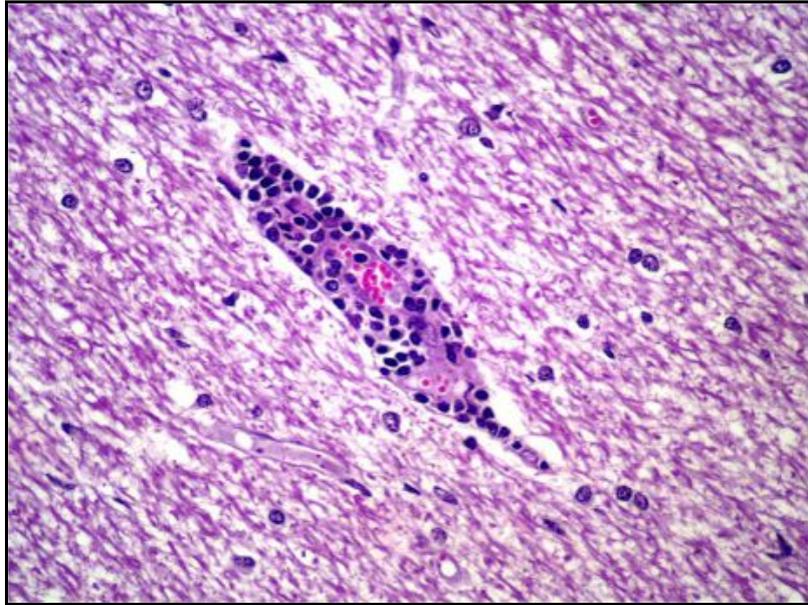


Fig. 13 Ovino 1. Pode ser observado leve infiltrado linfoplasmocitário em vaso do neuropilo na região medular do cerebelo. HE, 20X.

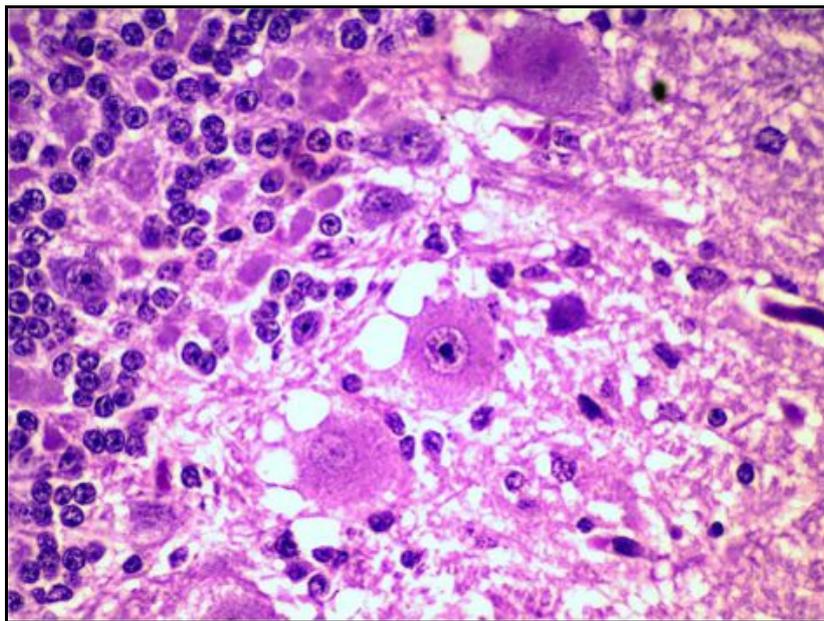


Fig. 14 Ovino 1. Encéfalo. Cerebelo. A imagem apresenta vacúolos perineuronais em células de Purkinje. HE, 40X.

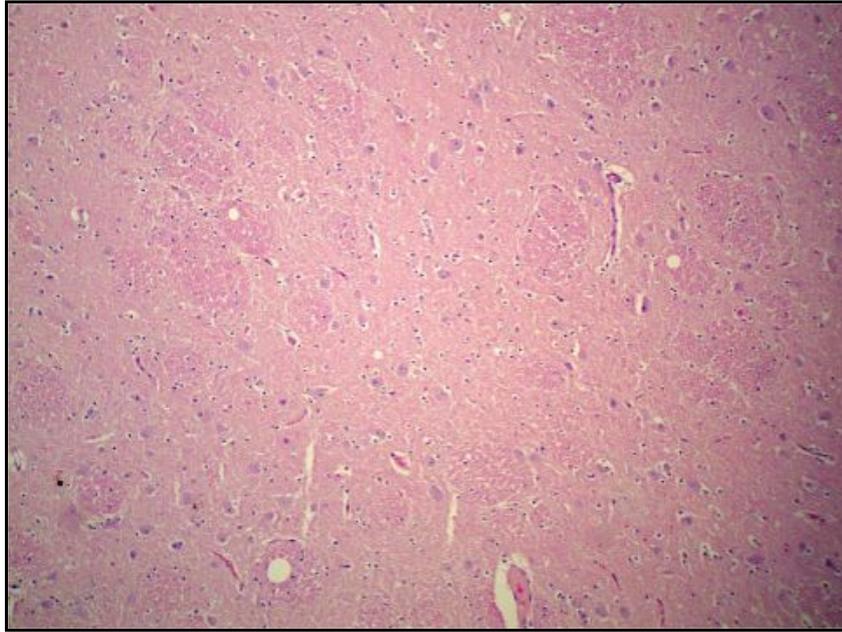


Figura 15 Ovino 2. Encéfalo. Observam-se pequenos vacúolos na substância branca dos núcleos da base. HE, 4X.

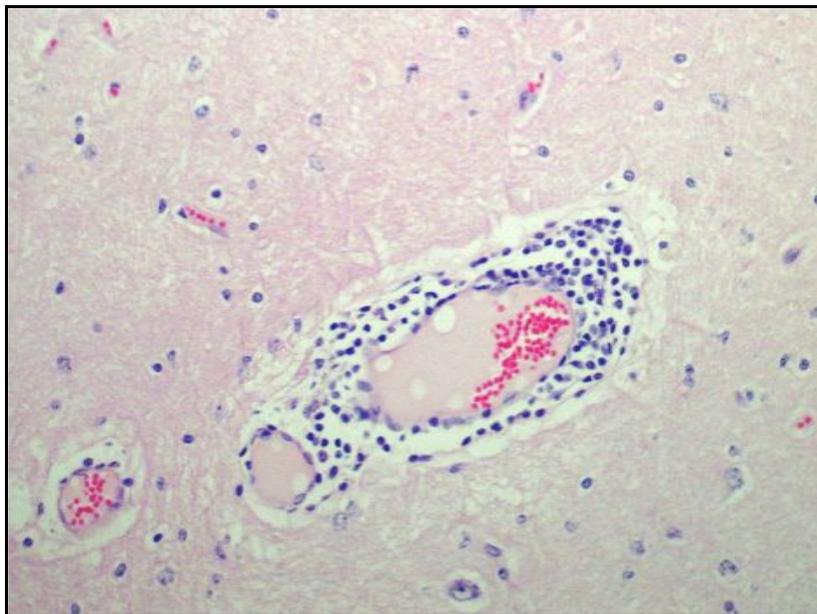


Fig. 16. Ovino 2. Hipocampo. Observa-se leve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular no neurópilo. HE, 20X.

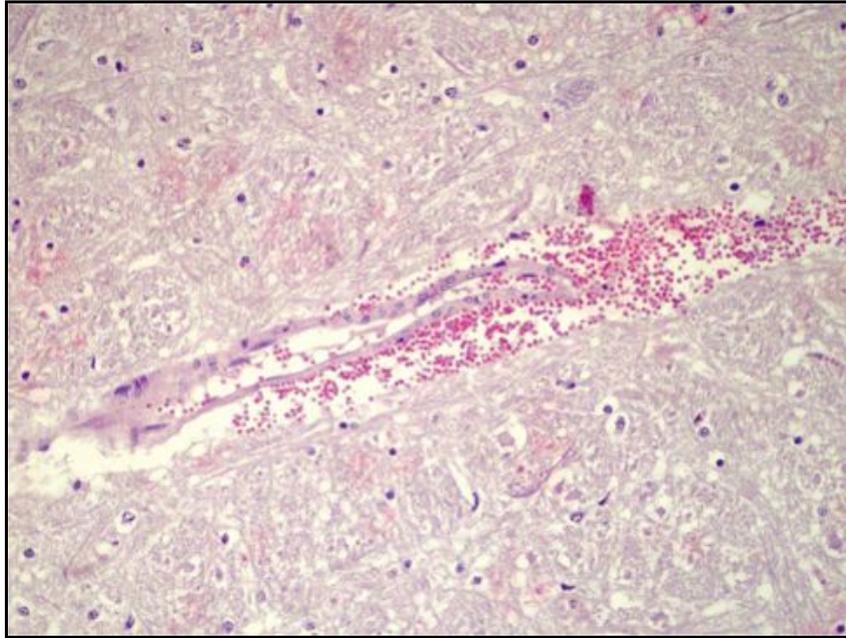


Fig. 17 Ovino 3. Encéfalo. Córtex frontal. Hemorragia no espaço de Virchow-Robin de vaso do neurópilo. HE, 20X.

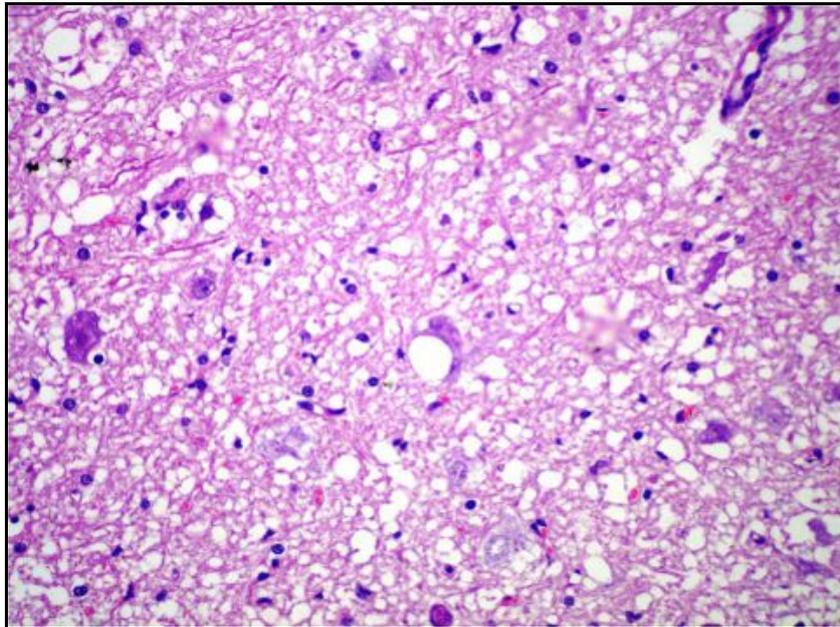


Fig. 18 Ovino 5. Encéfalo. Óbex. Podem ser observados vacúolos perineuronais e na substância branca. HE, 20X.

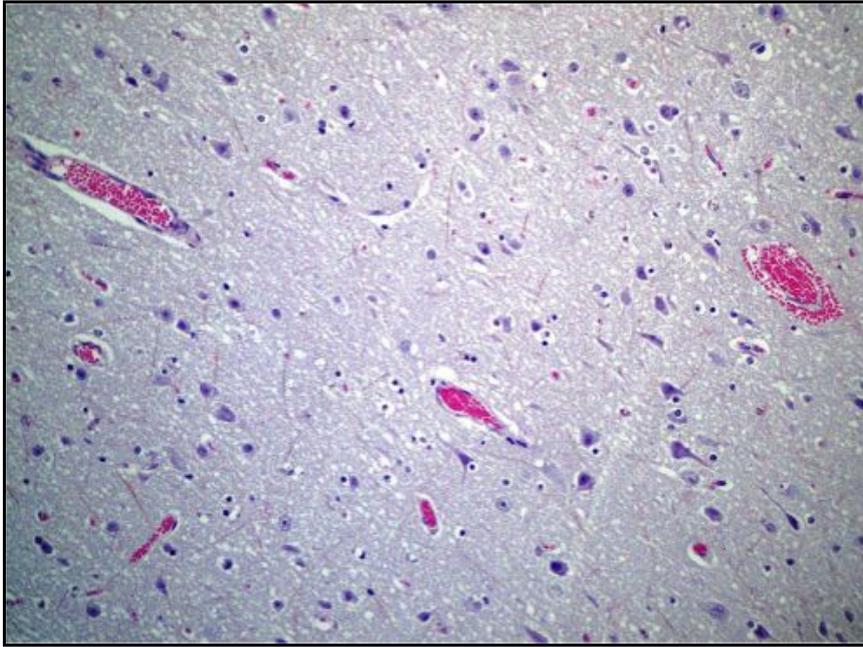


Fig. 19 Ovino 5. Encéfalo. Núcleos da base. Observa-se congestão difusa moderada e discreta hemorragia perivascular no neurópilo. HE, 10X.

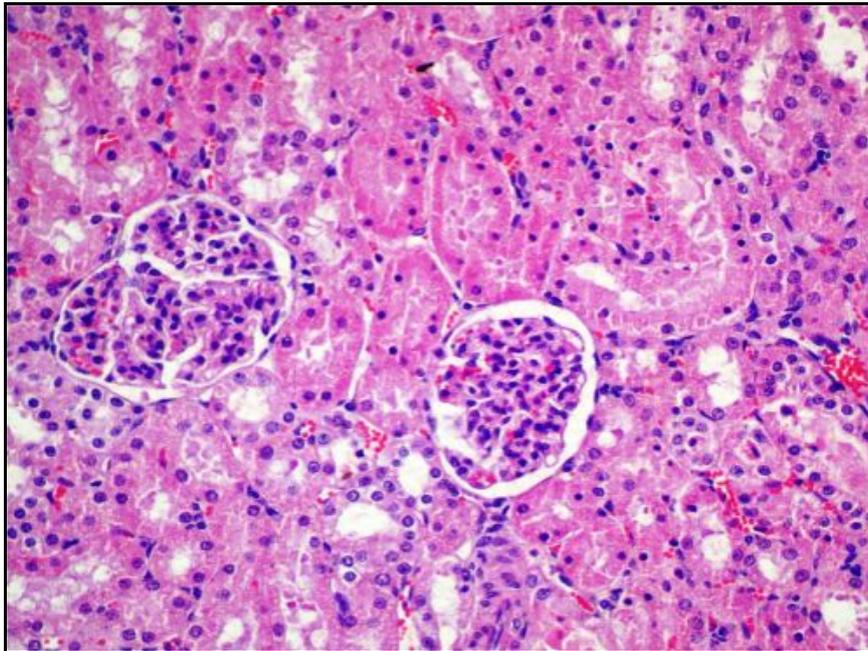


Fig. 20 Ovino 5. Rim. Visualiza-se uma área de necrose de células epiteliais de tubulos contorcidos proximais. Nota-se picnose e gotículas de proteína na luz de túbulos . HE. 20X.

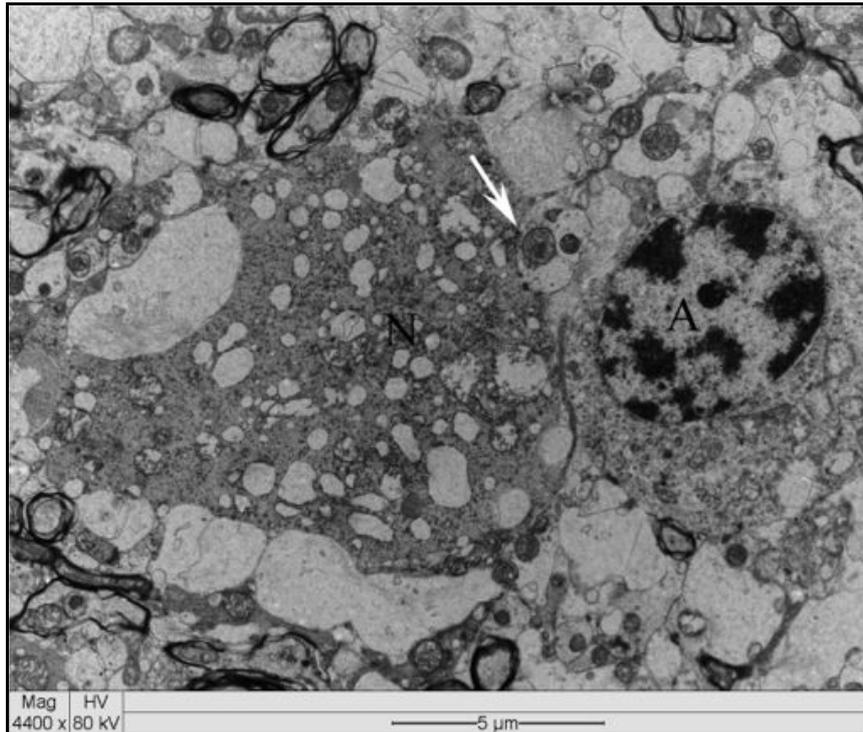


Fig. 21 Ovino 5. Encéfalo. Tronco encefálico. Neurônio (N) com as cisternas do retículo endoplasmático dilatadas, mitocôndrias tumefeitas e com lise das cristas e presença de vacúolos ao seu redor em consequência de processos astrocitários muito tumefeitos. Presença de sinapse entre dendrito e neurônio (seta). Astrócito (A).

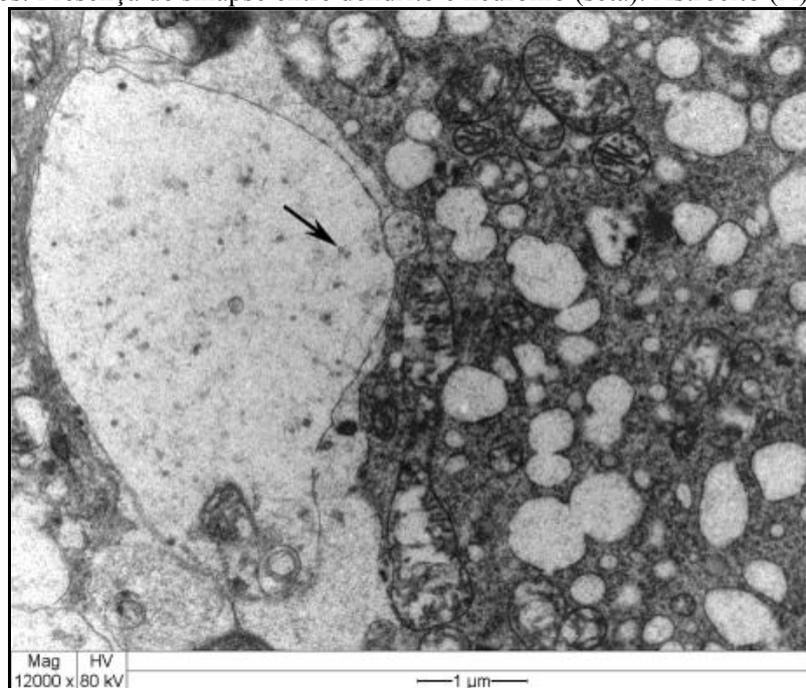


Fig. 22. Ovino 5. Encéfalo. Tronco encefálico. Dendrito tumefeito. Vesículas de neurotransmissores (seta). Neurônio exibindo dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso. Maior aumento da figura anterior.

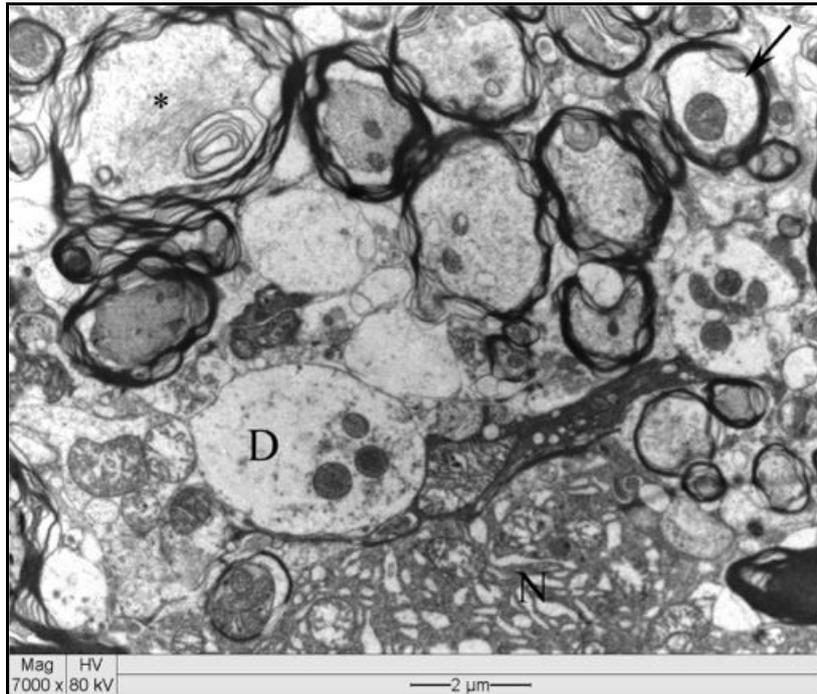


Fig. 23. Ovino 5. Encéfalo Tronco encefálico. Sinapse axossomática (entre D e N). Axônios tumefeitos e com restos de membrana (*). Axônio tumefeito e com desaparecimento dos microtúbulos (seta). Dendrito (D). Neurônio (N).

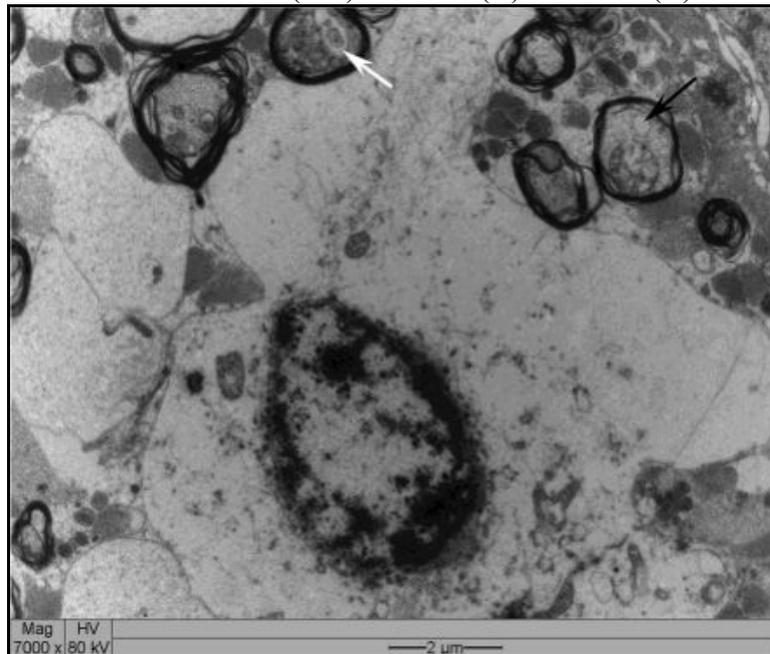


Fig. 24 Ovino 4. Encéfalo. Tronco encefálico. Observa-se astrócito tumefeito e circundado por vários prolongamentos astrocitários tumefeitos. No axônio da seta branca há uma mitocôndria tumefeita com a membrana rompida. Na seta preta este evento ainda não aconteceu. Note uma mitocôndria muito tumefeita com ruptura e desaparecimento das cristas, presença de um vacúolo e os microtúbulos já estão afastados entre si pelo acúmulo de líquido no axônio.



Fig. 25. Ovino 4. Encéfalo. Tronco encefálico. Vacuolização do neurópilo. Note a relação axônio/mielina (seta preta, axônio não afetado). Compare com o axônio tumefeito (*) e ao lado axônio com uma mitocôndria tumefeita, com a matriz eletrodensa, restos de membrana e com a ruptura da membrana mitocondrial (seta branca).

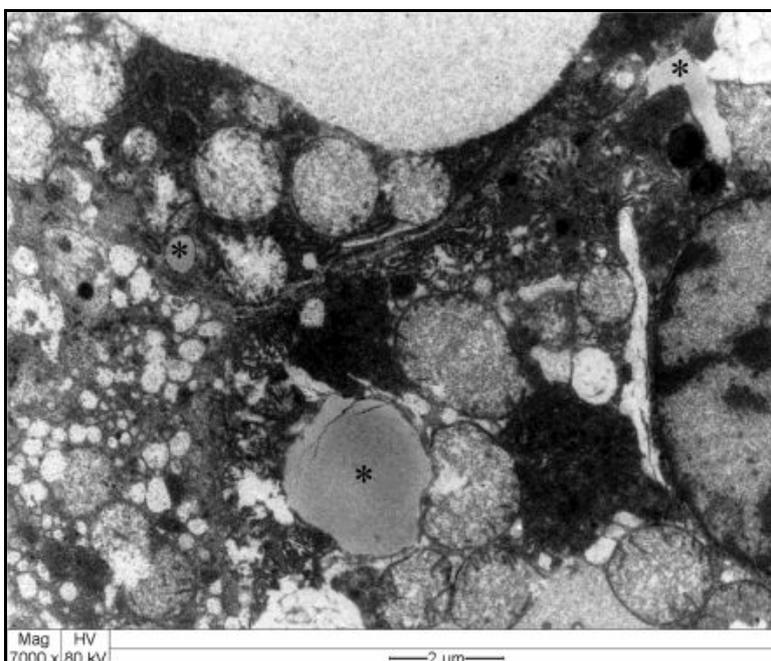


Fig. 26. Ovino 4. Fígado. Hepatócitos. Vacúolo delimitado por membrana com conteúdo granular (região superior). Vacúolos de lipídeos de diferentes tamanhos (*). Observam-se mitocôndrias tumefeitas e com lise das cristas (note os resquícios de cristas).

5 CONCLUSÕES

O herbicida clomazone é tóxico para ovinos e estes desenvolvem quadro de neuropatia tóxica. A dose única de 134 mg/kg de clomazone, administrada experimentalmente por via oral, causa intoxicação com sinais clínicos neurológicos e morte em ovinos.

A deriva acidental do herbicida clomazone e o contato dos ovinos com grande quantidade do produto foi o fator determinante para a ocorrência do surto de intoxicação.

Após um período de ausência de exposição ao herbicida clomazone os sinais clínicos regridem e os ovinos podem se recuperar.

Trinta dias após a exposição os animais ainda apresentam vestígios do princípio tóxico em músculos, fígado e rim, porém em quantidades não quantificáveis pelos métodos toxicológicos utilizados.

6 PERSPECTIVAS

- Acredita-se que a principal via de inoculação do clomazone nos ovinos do surto foi respiratória. Dessa forma, a reprodução experimental de intoxicação com clomazone, por via inalatória deve ser realizada.

- Resíduos do clomazone foi detectado em um animal cerca de 30 dias após a exposição. A avaliação de carcaças de ovinos intoxicados poderia elucidar quanto tempo depois da exposição esses animais ainda apresentam quantidades acima dos valores aceitáveis para consumo humano.

- Elucidar partes do mecanismo patogénico da intoxicação ainda se faz necessário. Avaliações da atividade da acetilcolinesterase no sistema nervoso central e em outros tecidos podem fornecer dados importantes a cerca da intoxicação.

7 REFERÊNCIAS

- Almeida, A., Schmitt, S., Bairos, B., Emanuelli, E. & Garcia, G. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. *Ciência Rural*, 37(5), 1506-1512. 2007
- Andrade, S.F.; Sakate, M.; Laposy, C. B.; Valente, S. F.; Bettanim, V. M.; Rodrigues, L. T.; Marciano, J. Effects of experimental amitraz intoxication in cats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1236-1244, 2007
- Anjos, B. L. Doença do Armazenamento Lisossomal Causada pela Ingestão Espontânea de Sida carpinifolia em Cervos Sambar (*Cervus unicolor*) Cativos no Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, UFRRJ, 2010.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil: Coleção Vallée. AGNS, São Paulo. 207p. 2006.
- Barros C.S.L. & Driemeier D. Intoxicação por organofosforados e carbamatos. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds). Doenças de ruminantes e equinos. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, pp.80-85. 2007.
- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Duarte M.D. & Albernaz T.T. Intoxicações com manifestações neurológicas em ruminantes. II Simpósio Mineiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG. 2005.
- Barbosa, J.D. et al. Intoxicação por organofosforados em rebanho de bovinos. In: Congresso Latino Americano De Buiatria, Salvador, BA. Anais. Salvador: Congresso Latino Americano de Buiatria, p 21. 2003.
- Barlow A.M., Sharpe J.A.E. & Kincaid E.A. Blindness in lambs due to inadvertent closantel overdose. *Vet. Rec.* 151(1):26-27. 2002.
- Beasley, V. Chapter 47: Organic Compounds that Affect the Lungs. In: *Veterinary Toxicology*. Ithaca: International Veterinary Information Services. 1999.
- Boermans H.J., Black W.D., Chesney R. & Robb S. Terbufos poisoning in a dairy herd. *The Canadian Veterinary Journal*. 25(9): 335-338.1984.
- Bretaudt, S., Toutant, J.P., Saglio, P., Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117-124. 2000.
- Caldas, L.Q.A. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e Piretroides. Niterói: Centro de Controle de Intoxicações de Niterói, 40p, 2000.
- Calderbank, A., McKenna, R.H., Stevens, M.A. & Walley, J.K. Grazing trials on paraquat-treated pasture. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 19(5), 246-250. 1968.

- Castro M.B., Moscardini A.G.C., Reis Jr J.L., Novaes E.P.F. & Borges J.R.J. Intoxicação aguda por diazinon em bovinos. *Ciência Rural* 37:1498-1501. 2007.
- Cordy DR, Richard WP, Bradford GE. Distrofia neuroaxonal sistêmica em Suffolk ovelhas. *Acta Neuropathol (Berl)* 8:133-140. 1967.
- Crestani M., Efeitos do herbicida clomazone sobre parâmetros metabólicos e antioxidantes em jundiá (*Rhamdia quelen*). Dissertação de Mestrado, UFSM, 2004.
- Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, V.P. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 65, 48–55. 2006.
- Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*. 67, 2305–2311. 2007.
- Dalto, A. G. C.; Albornoz, L.; Gonzalez, P. C. S.; Gomes, D. C.; Pedroso, P. M. O. ; Bandarra, P. M. Intoxicação por organofosforados em bezerros no Uruguai. *Acta Scientiae Veterinariae (UFRGS. Impresso)*, v. 39, p. 983-986, 2011.
- Driemeier D., Colodel E.M., Gimeno E.J. & Barros S.S. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in goats. *Vet. Pathol.* 37:153-159. 2000.
- Duarte, M.D.; Peixoto, P.V.; Bezerra Júnior, P.S.; Oliveira, K.D. de; Loretto, A.P.; Tokarnia, C.H. Intoxicação natural e experimental por amitraz em equídeos: aspectos clínicos. *Pesq. Vet. Bras.* 23(3) :105-118, 2003.
- Ecco, R., Barros, C.S.L.; Graça, D.L.; Gava, A. Closantel toxicosis in kid goats. *Vet. Rec.* 159: 564-566. 2006.
- Environmental Protection Agency. Clomazone Summary Document. Registration Review. United States. January 2007.
- Frank R., Braun H.E., Wilkie I. & Ewing R. A review of insecticide poisonings among domestic livestock in southern Ontario, Canada, 1982-1989. *Can. Vet. J.* 32:219-226. 1991.
- Furlan, F.H., Luciola J., Veronezi L.O., Medeiros A., Barros S.S., Traverso S.D. & Gava A. Spontaneous lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in cattle. *Vet. Pathol.* 46:343-347. 2009a.
- Furlan, F.H.; Luciola, J.; Borelli, V.; Fontque, J.H.; Stolf, L.; Traverso, S.D.; Gava, A. Intoxicação por closantel em ovinos e caprinos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29:89-93. 2009b.

- Garcia, S.J.; Aschner, M. & Syversen, T. Interspecies variation in toxicity of cholinesterase inhibitors, p.145-158. In: Gupta R.C. (Ed.), Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds. Elsevier Academic Press, San Diego. 2006.
- Gava, A. Intoxicação por organofosforados e carbamatos, P.208-211. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C. & Lemos R.A.A. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.2. Varela, São Paulo. 2001.
- Gill, P.A., Cook R.W., Boulton J.G., Kelly W.R., Vanselow B., Reddacliff L.A. Optic neuropathy and retinopathy in clostridial toxicosis in sheep and goats. *Austr. Vet. J.* 77: 259-261. 1999.
- Grecco F.B., Schild A.L., Soares M.P., Raffi M.B., Sallis E.S.V. & Damés M.C. Intoxicação por organofosforados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29:211-214. 2009.
- Guedes, K.M.R. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semiárido. Dissertação de Mestrado - Patos – PB: CSTR, UFCG, 2006.
- Guglielmone, A.A.; Castelli, M.E.; Volpogni, M.M.; Medus, P.D.; Martins, J.R.; Suarez, V.H.; Anziani, O.S.; Mangold, A.J. Toxicity of cypermethrin and diazinon to *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in its American southern range. *Vet Parasitol*, v.101, n.1, p.67-73, 2001.
- Gunasekara A.S, Dela Cruz I.D, Curtis M.J, Claassen V.P, Tjeerdema R.S. The behavior of clomazone in the soil environment. *Pest Manag Sci.* Jun;65(6):711-6. 2009.
- Jolly R.D. & Walkley S.U. Lysosomal storage diseases of animals: An essay in comparative pathology. *Vet. Pathol.* 34:159-163. 1997.
- Jortner, B. S. Mechanisms of Toxic Injury in the Peripheral Nervous System: Neuropathologic Considerations. *Toxicol Pathol*, 28: 54-69.2000.
- Kelly, D.F., Morgan, D.G., Darke, P.G.G., Gibbs, C., Pearson, H. & Weaver, B.M.Q. Pathology of acute respiratory distress in the dog associated with paraquat poisoning. *Journal of Comparative Pathology*, 88(2), 275-294.1978.
- Khan, O. Organophosphate poisoning in a group of replacement heifers and dry cows. *Canadian Veterinary Journal*, Guelph, v.42, p.561-563. 2001.
- Kirmser, E.M.D., Mártire, D.O., Gonzalez, M.C., Rosso, J.A. Degradation of the Herbicides Clomazone, Paraquat, and Glyphosate by Thermally Activated Peroxydisulfate. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12858–12862. 2010.
- Kizil, O.; Balıkcı, E.; Dabak, M.; Ozdemir, H. Amitraz intoxication in two cattle. *Revue Méd. Vét.*, 159, 3, 166-168. 2008.

Maxie M.G. & Youssef S. Nervous system, p.281-457. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.1. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. . 2007.

Mendonça, F. S; Freitas, S. H.; Dória, R. G. S.; Camargo, L. M.; Neto, J. E. Intoxicação por diclorvós e cipermetrina em bovinos em Mato Grosso – Relato de Caso. Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 11, n. 3, p. 743-749, 2010.

Miron, D.S., Silva, L.V.F., Golombieski, J.I., Baldissertoto, B., Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen* fingerlings. Ciência Rural 34 (5), 1465–1469.2004.

Oga, S. Praguicidas. In: Fundamentos de toxicologia (2ª ed., pp. 437-458). São Paulo: Atheneu Editora. 2003.

Oliveira-Filho J.C., Carmo P.M.S., Pierezan F., Tochetto C., Lucena R.B., Rissi D.R. & Barros C.S.L. Intoxicação por organofosforado em bovinos no Rio Grande do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira 30(10):803-806.2010.

Pereira L. Efeitos dos herbicidas clomazone e ametrina em parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e Da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutor em Ciências. São Paulo. 2012.

Peters, L.P. Efeito dos herbicidas ametrina e clomazoneno sistema antioxidante bacteriano. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Universidade de São Paulo. 126 p. 2011.

Philbey, A.W. & Morton, A.G. Paraquat poisoning in sheep from contaminated water. Australian Veterinary Journal, 79(12), 842-843. 2001.

Pugh W.S. An outbreak of organophosphate poisoning (Thimet) in cattle. Can. Vet. J. 16:56-58. 1975.

Radostits, O.M. et. al. Compostos organofosforados e carbamatos (organofosfatos). In: __Clínica veterinária. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1456-1459. 2002. Raffi, M.B., Rech, R.R., Sallis, E.S.V., Barros, S.S., Barros, C.S.L. Chronic cardiomyopathy and cerebral spongy changes in sheep experimentally fed Ateleiglaziioviana. Ciência Rural. 36, 1860-1866. 2006.

Raina R., Srivastava K.A. & Malik J.K. Effects of repeated topical application of dichlorvos on blood enzymes and its toxicity in Buffalo calves (*Bubalus bubalis*). Brit. Vet. J. 146:264-269. 1990.

Raina R. & Malik J.K. The therapeutic effects of 2,3-butanedione monoxime and atropine in severe dichlorvos intoxication in Buffalo calves. Vet. Res. Commun. 15(4):319-325. 1991.

- Rech R.R., Rissi D.R., Rodrigues A., Pierezan F., Piazer J.V.M., Kommers G.D. & Barros C.S.L. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebrais. *Pesq. Vet. Bras.* 26:183-189. 2006.
- Riet-Correa, F., Barros, S.S., Méndez, M.C., Gevehr-Fernandes, C., Pereira Neto, O.A., Soares, M.P., McGavin, M.D. Axonal degeneration in sheep caused by the ingestion of *Halimium brasiliense*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 478–486. 2009.
- Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Summers B.A. & Oliveira J.A. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration of cattle. *Cornell Vet.* 73:240-256. 1983.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borge J.R.J. (Ed.). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.2. Pallotti Gráfica e Editora. Santa Maria, RS. 2007.
- Riet-Correa, G. Terra F.F., Schild, A.L., Riet-Franklin, F., Barros, S.S. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malphiaceae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 25, 91-96. 2005.
- Riet-Correa F. Intoxicação por organoclorados, p.78-80. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. 1416p. 2007.
- Rivero, R. et al. Intoxicação por organoclorados (endosulfan) em bovinos no Uruguai. *Pesq. Vet. Bras.*, vol.31, no.4, p.277-280. 2011.
- Sakhaeaa, E.; Derakhshanfar, A. Polioencephalomalacia associated with closantel overdose in a goat. *Journal of the South African Veterinary Association*, 81(2): 116–117, 2010.
- Santi, A., Menezes, C., Duarte, M.M.F., Leitemperger, J., Lopes, T., Loro, V.L. Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). *Interdiscip Toxicol.* 4, 149–153. 2001.
- Seitz A.L., Colodel E.M., Schmitz M., Gimeno E.J. & Driemeier D. Use de lectin histochemistry to diagnose *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in sheep. *Vet. Rec.* 156:386-388. 2005.
- Seixas, J.N.; Peixoto, P. V.; Armíén A. G.; Jabour F. F.; Brito M. F. Aspectos clínicos e patogénicos da intoxicação por abamectina em bezerras, *Pesq. Vet. Bras.* v.26(3): p.161-166. 2006.
- Serra, A., Domingos, F., Prata, M.M. Intoxicação Por Paraquat. *Acta Médica Portuguesa*. 16, 25-32. 2003.
- Sisó, S. Hanzlícek, D., Fluehmann, Kathmann, G. I. ; Tomek, A., Papa, V., Vandevelde, M. Neurodegenerative diseases in domestic animals: A comparative review. *The Veterinary Journal*. Vol. 171. Pág. 20–38. 2006.

- Smith B.P. Medicina Interna de Grandes Animais. 3ª ed. Manole, Barueri, p.255-386. 2006.
- Souza, M.V., Graça, D.L., Cervo, D. Neurotoxicidade tardia experimentalmente induzida por haloxon em ovinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 48: 275-286. 1996.
- Soares A.C., Dias M.M., Traverso S.D. & Driemeier D. Intoxicação acidental por carbamatos em bovinos de corte no sul do Brasil. 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, RS, p.714. (Resumo). 2002.
- Spinosa, Helenice DE Souza, Górnaiak, Silvana Lima. Neto, João Palermo. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Barueri, SP: Manole, 2008.
- Stamp, J. T., Brotherston, J. G., Zlotnik, I., Mackay, J. M. II., and Smith, W. J. *Comp. Path.*, 69, 268. 1959.
- Stigger, A.L., Barros, C.S.L., Langohr, I.M., Barros, S.S. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 21, 98-108. 2001.
- Summers B.A., Cummings J.F., De Lahunta A. *Veterinary Neuropathology*. Mosby Year Books, St Louis, Missouri. 527p. 1995.
- Suntres, Z.E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 180(1), 65-77. 2002.
- Van der Lugt, J. J., Olivier, J. and Jordaan, P. Status spongiosis, optic neuropathy, and retinal degeneration in *Helichrysum argyrosphaerum* poisoning in sheep and a goat. *Veterinary Pathology*, 33, 495-502. 1996.
- Van der Lugt, J. J.; Venter L. Myelin vacuolation, optic neuropathy and retinal degeneration after closantel overdosage in sheep and in a goat. *Veterinary Pathology* 33: 495–502, 2007.
- Van Kampen, K.R. y James, L.F. Pathology of locoweed poisoning in sheep *Path. Vet.* 6: 413- 423. 1969.
- Webb, D. B. Nephrotoxicity of Paraquat in the Sheep and the associated reduction in Paraquat secretion *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* Vol 68 Pág. 282–289. 1983.
- Wesseling, C.; Joode, B. V. W. Ruppert, C.; León, C.; Monge, P.; Hermosillo, H.; Partanen, T. J. Paraquat in Developing Countries. *Int J Occup Environ Health*, 7: 275–286, 2001.
- Zachary, J.F. Nervous System, P.914-915. IN: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis. 2007.
- Zanella, R.; Primel, E. G.; Gonçalves, F.F.; Martins, A. F. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water *J. Chromatogr. A* 904. 257 –262. 2000.