

Ingestão voluntária de *Marsilea ancylopoda* por equinos em área de pastagem

Marsilea ancylopoda voluntary intake by horses in pasture area

Juliana Skalski^[a], João Ricardo Dittrich^[b], Giovanna Mazur Karach^[c], João Paulo Gomes de Carvalho^[d], Valdir Roberto Tonin^[e], Maria Aparecida de Carvalho Patrício^[f]

^[a] Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: julianaskalski@ufpr.br

^[b] Professor do Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: dittrich@ufpr.br

^[c] Aluno do curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: giovannakarach@hotmail.com

^[d] Aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: joaopaulo_carvalho@zootecnista.com.br

^[e] Médico Veterinário, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: valdiroberto@globo.com

^[f] Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: macpatricio@seab.pr.gov.br

Resumo

A partir dos históricos de episódios clínicos e óbitos de equinos, compatíveis com sinais clínicos de intoxicação por tiaminase I, em área de pastagem em Almirante Tamandaré (PR), a espécie *Marsilea ancylopoda* foi identificada como uma das espécies predominantes na referida área. As samambaias do gênero *Marsilea* sp. contêm o composto tóxico tiaminase I, que, quando ingerido pelos animais, destrói a tiamina (vitamina B1) antes de sua absorção pelo organismo, o que causa a deficiência dessa vitamina. O sistema nervoso é especialmente afetado por esta deficiência, que pode levar ao óbito se não tratada. O presente estudo avaliou o comportamento ingestivo de éguas em áreas de pastagem com presença de *Marsilea ancylopoda*. Oito éguas foram analisadas e divididas em quatro grupos (duas repetições, com duas éguas em cada grupo): dois grupos em uma área de pastagem com presença de *Marsilea ancylopoda* e dois grupos em área sem *Marsilea ancylopoda*. O comportamento ingestivo de cada animal foi observado por dez horas, em cinco períodos de duas horas, dos dias 04, 05 e 06 de fevereiro de 2013. Os animais foram monitorados por exames clínicos e laboratoriais durante o período experimental. A ingestão voluntária da *Marsilea ancylopoda* foi comprovada por amostragem focal, identificada pela mediana de três visualizações em cada um dos cinco períodos de observação. No período experimental não foram observadas alterações clínicas ou laboratoriais. A ingestão de *Marsilea ancylopoda* por éguas em pastejo é voluntária e não depende da proporcionalidade da espécie na pastagem. Os históricos de episódios clínicos e óbitos de equinos relatados na área com a presença de *Marsilea ancylopoda* sugerem a intoxicação por tiaminase. Portanto, a possibilidade de intoxicação merece ser considerada e avaliada em áreas onde essa espécie é encontrada.

Palavras-chave: Marsileaceae. Tiaminase I. Cavalos. Plantas tóxicas.



Abstract

Based on reports of clinical episodes and deaths in horses in a pasture area in Almirante Tamandaré, Paraná, which were consistent with the clinical signs of thiaminase I poisoning, *Marsilea ancylopoda* was identified as one of the predominant species in the area. Genus *Marsilea* sp. ferns contain the toxic compound thiaminase I, which, when ingested by animals, destroys thiamine (vitamin B1) before it can be absorbed by the body, thereby resulting in vitamin B deficiency. The nervous system is especially affected by this deficiency, which can lead to death if not treated. This study evaluated the intake behaviors of mares in pasture areas with or without *Marsilea ancylopoda* presence. Eight mares were analyzed and divided into four groups (two duplicates, with two horses in each group): two groups in a pasture area with *Marsilea ancylopoda* presence and two groups in an area without *Marsilea ancylopoda*. Each animal's intake behavior was observed for a total of 10 hours, in five two-hour periods on February 4, 5, and 6, 2013. The animals were monitored by clinical and laboratorial exams during the experimental period. Voluntary intake of *Marsilea ancylopoda* was examined by focal sampling, and calculated as the median of three samples in each period of the five observation periods. During the experimental period, no clinical or laboratorial abnormalities were observed. *Marsilea ancylopoda* intake by mares is voluntary and independent from the species proportionality in the pasture. The clinical episodes reported in horses in the area with *Marsilea ancylopoda* presence suggests thiaminase poisoning. Therefore, the possibility of poisoning deserves to be considered and evaluated in areas where such species is found.

Keywords: Marsileaceae. Thiaminase I. Horses. Poisonous plants.

Introdução

O ponto de partida deste estudo foi uma série de oito casos clínicos em equinos com sinais neurológicos sem diagnóstico conclusivo em uma propriedade no município de Almirante Tamandaré (PR). As ocorrências de animais com incoordenação motora, quedas e movimento de pedaleira foram relatadas entre 2005 e 2008. Os casos ocorriam apenas em animais alojados em um determinado piquete da propriedade e cessaram depois que essa área deixou de ser utilizada. Ao terem contato com a área e seu histórico, os autores identificaram a presença de *Marsilea ancylopoda* entre as espécies vegetais do local, surgindo a hipótese do envolvimento desta espécie nos casos clínicos.

O gênero *Marsilea* spp. (Marsileaceae Mirb.) é constituído por samambaias perenes, aquáticas ou anfíbias, com folhas compostas por dois pares de folíolos obdeltóides dispostos transversalmente sobre um pecíolo, configurando um aspecto de “trevo de quatro folhas” (Figura 1). Sua reprodução se dá por esporocarpos, estruturas rígidas sustentadas por pedúnculos que germinam em resposta a alterações na umidade do solo, além de serem extremamente resistentes a secas (Jacono e Johnson, 2006; Offord, 2006). Já foram identificadas

cinco espécies de *Marsilea* spp. no Brasil, sendo *Marsilea ancylopoda* a única encontrada no estado do Paraná, além de estar presente na Bahia, em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul (Xavier et al., 2012; Windisch, 2012).

As plantas desse gênero contêm tiaminase I, enzima que promove a decomposição da tiamina (vitamina B1) (Hanes et al., 2007; McCleary e Chick, 1977). Surto de intoxicação por *Marsilea drummondii* foram descritos, inicialmente, em



Figura 1 – *Marsilea ancylopoda* encontrada na área onde ocorreram os casos clínicos

ovinos na Austrália, nos anos 1970, apresentando sinais clínicos indistinguíveis de poliencefalomalácia (McCleary et al., 1980). Casos de intoxicação em equinos, embora raros, também são relatados na Austrália (Offord, 2006; Radostits et al., 2007).

A tiamina atua como co-carboxilase no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas (Radostits et al., 2007), atuando especialmente no ciclo de Krebs e na via das pentoses-fosfato (Sant'Ana et al., 2009). Sua deficiência é caracterizada por sinais clínicos neurológicos, e embora associem-se esses sinais ao fato de o sistema nervoso ser altamente dependente do metabolismo de carboidratos como fonte de energia, essa relação ainda não é bem compreendida (Radostits et al., 2007; Sant'Ana et al., 2009). A tiaminase I é também encontrada em outras pteridófitas amplamente reconhecidas como tóxicas, como *Pteridium aquilinum*, *Cheilanthes sieberi*, *Equisetum* spp., e também em angiospermas como *Amaranthus blitoides* e *Malva parviflora* (Ramos et al., 2005; Offord, 2006; Radostits et al., 2007). A atividade de tiaminase I em *Marsilea drummondii*, todavia, pode chegar a níveis 100 vezes mais altos que os encontrados em *Pteridium aquilinum* (McCleary e Chick, 1977).

A partir do histórico de casos clínicos compatíveis com intoxicação por tiaminase na propriedade mencionada no município de Almirante Tamandaré (PR), associada à presença de *Marsilea ancylopoda* na pastagem, este trabalho teve por objetivo verificar se a ingestão desta planta pelos animais é voluntária. Pretendeu-se evitar assim a realização de ensaio de intoxicação experimental em um primeiro momento, visando reduzir o sofrimento animal, e apoiando-se para isso nas informações sobre a toxicidade do gênero na literatura, apontando para altos níveis de atividade de tiaminase I nessas espécies. Para evitar o risco de intoxicação acidental, foi estabelecido um período de avaliação curto, suficiente somente para verificar se os animais realmente ingerem espontaneamente a planta.

Material e método

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências

Agrárias da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo número 013/2012.

Os autores tiveram o primeiro contato com a área e seu histórico em 2012, quando realizaram uma identificação das espécies vegetais presentes no local e identificaram, em parceria entre o Departamento de Zootecnia e o Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, a presença de *Marsilea ancylopoda*. Os dados epidemiológicos e clínicos sobre o surto foram obtidos em entrevista com os médicos veterinários que atenderam os animais na ocasião.

A etapa experimental do trabalho foi realizada na mesma propriedade onde ocorreram os casos descritos, no município de Almirante Tamandaré, na Região Metropolitana de Curitiba (PR), em fevereiro de 2013. Quatro piquetes de 2000 metros quadrados foram demarcados na área sendo que em dois destes havia ocorrência de *Marsilea ancylopoda*. As demais espécies vegetais predominantes nos piquetes incluíam *Pennisetum clandestinum*, *Leersia hexandra*, *Cynodon* sp, *Paspalum* sp, *Cyperus* sp e *Trifolium repens*, nenhuma delas com potencial conhecido para causar intoxicações com sinais clínicos semelhantes aos dos casos relatados no local.

Foram utilizadas oito éguas adultas, vazias, de aproximadamente 450 quilogramas, divididas em dois tratamentos; um em pasto com *M. ancylopoda* e outro sem *M. ancylopoda*, cada tratamento com duas repetições, totalizando quatro grupos. Os animais eram provenientes da própria região, mas não tinham contato anterior com a área do experimento ou a espécie *M. ancylopoda*.

A massa de forragem em quilogramas de matéria seca por hectare (kg MS/ha) dos piquetes foi determinada por cinco pontos amostrados ao acaso ao início do experimento e a composição proporcional das espécies foi quantificada. Após a adaptação dos animais nos piquetes na manhã do primeiro dia, o comportamento ingestivo dos animais foi observado por avaliadores previamente treinados durante dez horas, em cinco períodos de duas horas - duas horas à tarde do dia 04 de fevereiro de 2013, duas horas pela manhã e duas horas à tarde nos dias 05 e 06 de fevereiro de 2013. A observação de pastejo foi realizada por amostragem focal a cada dez minutos, identificando-se as espécies consumidas. Todos os animais experimentais foram

monitorados no início da manhã e no fim da tarde por meio de exames clínicos (incluindo avaliação de frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar e temperatura retal) e avaliação dos níveis séricos de glicose e lactato durante os três dias de experimento mais o dia seguinte à sua retirada da área.

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Action versão 2.6. Os dados de massa de forragem e comportamento ingestivo foram analisados por estatística descritiva. Os parâmetros clínicos e laboratoriais dos animais dos dois grupos foram comparados por análise de variância, seguida pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e discussão

O histórico da área aponta a ocorrência de animais que apresentaram sinais neurológicos após serem alojados em um piquete localizado em uma área alagável próximo ao rio Barigui. Os primeiros casos tiveram início em 2005, com novas ocorrências nos anos seguintes, toda vez que animais eram colocados no local, até que a área deixou de ser utilizada, três anos depois. Nesse período, oito animais foram acometidos e quatro foram a óbito. Os animais afetados apresentavam incoordenação motora, movimento de pedalagem e caíam com facilidade. Incoordenação motora e quedas estão entre os sinais clínicos de intoxicação por *Marsilea* spp. mencionados na literatura, bem como perda de peso, postura anormal, tremores, irregularidade de batimentos cardíacos, balançar de cabeça, manter a cabeça próxima ao solo, contrações das orelhas e cegueira parcial, com hipossensibilidade a estímulos externos, movimentos convulsivos e aumento da temperatura corporal e frequência cardíaca na fase final (Offord, 2006; Radostits et al., 2007). O início dos sinais clínicos nos casos relatados não se relacionava com o tempo após a entrada no piquete, mas à ocorrência de chuvas associadas a alagamentos, que são frequentes no local. Esse fato merece destaque por ter sido demonstrado que a atividade de tiaminase nas plantas do gênero atinge seus níveis mais altos

nos estágios iniciais de crescimento de plantas desse gênero, o que ocorre, principalmente, após períodos chuvosos e alagamentos, condições que favorecem sua reprodução (McCleary e Chick, 1977; Offord, 2006). O tratamento aplicado na época foi sintomático, baseado na administração de corticoides.

Na necropsia não foram observadas alterações macroscópicas, porém o material não foi enviado para exame histopatológico. Segundo Radostits et al. (2007), em casos de equinos intoxicados por *Marsilea* spp. não se registraram alterações *post mortem*, exceto eventuais lesões de insuficiência cardíaca congestiva ou aguda. Os animais mortos tiveram o encéfalo coletado e enviado ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná), em Curitiba, para diagnóstico de raiva, seguido de semeadura da amostra em ágar para cultivo bacteriano e exames para Encefalomielite Equina do Leste (EEE) e Encefalomielite Equina do Oeste (EEW), com resultados negativos em todos os testes. A água do local também foi avaliada com o intuito de detectar a presença de metais pesados, porém não foram identificados níveis tóxicos. Apesar de os autores não terem tido acesso aos animais que adoeceram na época da ocorrência, os sinais clínicos relatados e a epidemiologia do surto se assemelham, consideravelmente, com o descrito na literatura para intoxicações por *Marsilea* sp. (Offord, 2006; Radostits et al., 2007).

No experimento de ingestão voluntária, a massa de forragem inicial média nos piquetes de tratamento foi de 2041,92 kg MS/ha, com uma composição de 7,1% *M. ancylopoda*, 49,7% gramíneas, 2,9% leguminosas e 40,2% outras espécies. A massa de forragem e a proporção de gramíneas e leguminosas na pastagem demonstram que havia disponibilidade de alimento suficiente para os animais não evitarem a *M. ancylopoda* se quisessem. Porém, na observação de pastejo confirmou-se a ingestão da planta pelos animais, sendo que a mediana das visualizações de ingestão de *M. ancylopoda* pelos animais em cada período de duas horas de observação foi de 3 (com moda 3 e média 3,7 visualizações por período). Observou-se que a *M. ancylopoda* não era rejeitada ou evitada pelos animais, embora não

fosse diretamente buscada por eles, não sendo o foco principal dos bocados.

Os parâmetros clínicos e laboratoriais dos animais durante o período experimental mantiveram-se dentro dos valores de referência para a espécie em todos os grupos, não apresentando alterações significativas ao teste de Tukey entre os grupos em pasto com e sem

M. ancylopoda a um nível de significância de 5% (Tabelas 1 e 2).

A ausência de alterações clínicas está associada ao tempo propositalmente curto que os animais foram mantidos nos piquetes e à presença de outras espécies vegetais disponíveis para pastejo, permitindo que a dieta não fosse exclusivamente de *Marsilea* sp. Embora não haja dados na literatura

Tabela 1 – Parâmetros clínicos avaliados durante o ensaio de ingestão voluntária (média ± desvio padrão)

| | | Dia 1 | | Dia 2 | | Dia 3 | | Dia 4 | | Média Total |
|-----|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|
| | | M | M | T | M | T | M | T | | |
| FC | SM | 38,0±1,6 | 37,3±2,2 | 39,0±2,0 | 38,0±9,5 | 43,0±3,8 | 39,0±6,8 | 39,0±6,8 | 39,0±5,1 | |
| | CM | 47,5±6,6 | 39,5±5,7 | 41,5±1,9 | 41,5±5,0 | 38,3±5,1 | 39±5,0 | 41±1,2 | 41,2±5,1 | |
| FR | SM | 9,0±2,0 | 9,8±2,9 | 12,8±3,0 | 10,8±1,9 | 13,8±2,6 | 10,5±1,9 | 10,5±1,9 | 11,0±2,6 | |
| | CM | 13,0±2,6 | 10,5±1,0 | 12,3±2,9 | 14,3±1,0 | 13,3±3,5 | 11,5±1,0 | 10,5±1,0 | 12,2±2,3 | |
| TPC | SM | 3,0±0,8 | 2,8±0,5 | 3,0±0 | 2,5±0,6 | 2,5±0,6 | 2,0±0 | 2,0±0 | 2,5±0,6 | |
| | CM | 2,5±0,6 | 2,5±0,6 | 2,5±0,6 | 2,5±0,6 | 2,3±0,5 | 2,3±0,5 | 2,0±0 | 2,4±0,5 | |
| TR | SM | 37,4±0,2 | 37,3±0,3 | 37,5±0,1 | 37,3±0,2 | 37,6±0,2 | 37,3±0,6 | 37,3±0,6 | 37,4±0,3 | |
| | CM | 37,2±0,1 | 37,3±0,2 | 37,6±0,3 | 37,3±0,2 | 37,6±0,3 | 37,0±0,3 | 37,5±0,5 | 37,3±0,4 | |

Legenda: FC= Frequência cardíaca, FR= Frequência respiratória, TPC= Tempo de Preenchimento Capilar, TR= Temperatura retal, M= manhã, T= tarde, SM= médias dos grupos que não ingeriram *Marsilea ancylopoda*, CM= médias dos grupos que ingeriram *Marsilea ancylopoda*.

Tabela 2 – Parâmetros laboratoriais avaliados durante o ensaio de ingestão voluntária (média ± desvio padrão)

| | | Dia 1 | | Dia 2 | | Dia 3 | | Dia 4 | | Média Total |
|---------|----|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-------------|
| | | M | M | T | M | T | M | T | | |
| Lactato | SM | 1,97±0,4 | 1,10±0,1 | 1,10±0,1 | 1,03±0,2 | 1,49±0,2 | 1,03±0,3 | 1,53±0,2 | 1,29±0,4 | |
| | CM | 1,81±0,3 | 1,06±0,2 | 0,96±0,1 | 1,03±0,4 | 1,60±0,2 | 0,91±0,4 | 1,34±0,3 | 1,24±0,4 | |
| Glicose | SM | 94,9±5,9 | 99,8±7,3 | 98,0±2,4 | 99,0±5,9 | 91,3±6,6 | 99,0±5,4 | 90,0±4,3 | 94,74±6,9 | |
| | CM | 95,6±1,8 | 95,8±20,3 | 98,5±6,1 | 97,8±3,0 | 90,0±5,2 | 99,8±2,3 | 93,3±5,7 | 94,76±8,3 | |

Legenda: TPC= Tempo de Preenchimento Capilar, M= manhã, T= tarde, SM= médias dos grupos que não ingeriram *Marsilea ancylopoda*, CM= médias dos grupos que ingeriram *Marsilea ancylopoda*.

sobre o tempo de pastejo e quantidade de *Marsilea* sp. necessários para que ocorra intoxicação, informações para *P. aquilinum*, que também possui tiaminase, apontam períodos entre 11 dias até 4 semanas até o início dos sinais clínicos, com a planta tóxica em proporções de até 50% da dieta (Radostits et al., 2007; Santos, 2010). Além disso, no período em que foi realizada a observação de ingestão voluntária, não houve chuvas e a área não estava alagada, fatores apontados como associados à ocorrência dos episódios clínicos pelos profissionais que acompanharam os casos.

Conclusão

Os históricos de episódios clínicos e óbitos de equinos relatados na área de pastagem estudada apontam para a ocorrência de intoxicação por tiaminase. O consumo de *Marsilea ancylopoda* pelos animais deste estudo foi voluntário mesmo com a planta em menor disponibilidade relativa às outras espécies vegetais existentes na área. No período de tempo e sob as condições em que foi realizada a observação de ingestão voluntária, esse consumo não se demonstrou suficiente para desencadear sinais de intoxicação. A confirmação da ingestão voluntária da planta associada às semelhanças epidemiológicas e clínicas do histórico dos animais que adoeceram na área com as características dos surtos por *Marsilea* sp. descritos na literatura, demonstram que a possibilidade de intoxicação deve ser considerada e avaliada em regiões onde essa espécie ocorre, sendo necessário alertar e orientar os proprietários de animais nesses locais.

Referências

- Hanes JW, Kraft CE, Begley TP. An assay for thiaminase I in complex biological samples. *Analytical biochemistry*. 2007; 368(1):33-38. doi: 10.1016/j.ab.2007.06.001.
- Jacono CC, Johnson DM. Water-clover Ferns, *Marsilea*, in the Southeastern United States. *Castanea*. 2006; 71(1):1-14. doi:10.2179/05-1.1.
- McCleary B V., Kennedy CA, Chick BF. Nardoo, bracken and rock ferns cause vitamin B1 deficiency in sheep. *Agricultural Gazette of New South Wales*. 1980; 91(5):40-43.
- McCleary B V, Chick BF. The purification and properties of a thiaminase I enzyme from nardoo (*Marsilea drummondii*). *Phytochemistry*. 1977; 16(2):207-213. doi:10.1016/S0031-9422(00)86787-4.
- Offord M. *Plants poisonous to horses: an Australian field guide*. Sydney: Rural Industries Research and Development Corporation; 2006.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses*. 10. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
- Ramos JJ, Ferrer LM, García L, Fernández A, Loste A. Polioencephalomalacia in adult sheep grazing pastures with prostrate pigweed. *The Canadian Veterinary Journal*. 2005; 46(1):59-61.
- Sant'Ana FJF, Lemos RAA, Nogueira APA, Togni M, Tessele B, Barros CSL. Polioencefalomalácia em ruminantes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009; 29(9):681-694. doi:10.1590/S0100-736X2009000900001.
- Santos BJM. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação experimental por *Pteridium arachnoideum* (Dennstatiaceae) em equinos. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- Xavier SRS, Barros ICL, Santiago ACP. Ferns and lycophytes in Brazil's semi-arid region. *Rodriguésia*. 2012; 63(2):483-488. doi:10.1590/S2175-78602012000200021.
- Windisch PG. Marsileaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 09 jul. 2014.

Recebido em: 08/10/2015
Received in: 10/08/2015

Aprovado em: 16/03/2016
Approved in: 03/16/2016