

## Miopatía tóxica en cerdos intoxicados experimentalmente a partir del consumo de frutos de *Senna occidentalis*

### TOXIC MYOPATHY IN EXPERIMENTALLY INTOXICATED PIGS DUE TO CONSUMPTION OF *Senna occidentalis* PODS AND SEEDS

Gabriela S. Chileski<sup>1</sup>, Elvio E. Rios<sup>1</sup>, Walter J. Lértora<sup>1</sup>, Pamela G. Teibler<sup>1</sup>, Julián Parada<sup>2</sup>, Luciana A. Cholich<sup>1,3</sup>

#### RESUMEN

Se describen los hallazgos clínicos y patológicos del envenenamiento experimental por *Senna occidentalis* en cerdos. Seis cerdos se distribuyeron en dos grupos, uno de los cuales se alimentó con una ración que contenía 10% de vainas y semillas de *S. occidentalis* por 30 días y el otro grupo permaneció como grupo control. Los animales intoxicados mostraron letargia, ataxia, temblores musculares, emaciación y recumbencia. La enzima creatina fosfoquinasa aumentó significativamente en los cerdos intoxicados con *S. occidentalis* ( $p < 0.05$ ). La histopatología reveló que los cerdos intoxicados mostraron principalmente degeneración de las fibras musculares y fibrosis en los músculos esqueléticos. La microscopía electrónica reveló lesiones mitocondriales. Los resultados confirman el efecto miotóxico de la intoxicación crónica por *S. occidentalis* en cerdos.

**Palabras clave:** necrosis muscular; producción porcina; planta tóxica

#### ABSTRACT

The clinical and pathological findings of the experimental poisoning by *Senna occidentalis* in pigs are described. Six pigs were distributed into two groups, one of which was fed a ration containing 10% pods and seeds of *S. occidentalis* for 30 days and

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Corrientes, Argentina

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

<sup>3</sup> E-mail: lucianaandreacholich@gmail.com

El estudio fue financiado por el Proyecto de Investigación PI: B009-2013, otorgado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE

Recibido: 2 de noviembre de 2017

Aceptado para publicación: 6 de abril de 2018

the other group remained as a control group. The intoxicated animals showed lethargy, ataxia, muscular tremors, emaciation and recumbency. The enzyme creatine phosphokinase increased significantly in pigs intoxicated with *S. occidentalis* ( $p < 0.05$ ). The histopathology revealed that the intoxicated pigs mainly had degeneration of the muscle fibres and fibrosis in the skeletal muscles. Electron microscopy revealed mitochondrial lesions. The results confirm the myotoxic effect of chronic poisoning by *S. occidentalis* in pigs.

**Key words:** muscular necrosis; pig production; toxic plant

## INTRODUCCIÓN

*Senna occidentalis* es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia *Leguminosae* y subfamilia *Caesalpinioideae*, conocida en el Norte Argentino como cafetillo, falso café, pico de pájaro, café salvaje y hierba hedionda (Sala y Cape, 2014). Puede ser diferenciada de otras especies del género por el aspecto del fruto, el cual en esta especie crece con la extremidad libre hacia arriba (Tokarnia *et al.*, 2012). Es una planta ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en áreas con pastos bajos y de suelo fértil o en campos cultivados y con alta carga animal (Barros *et al.*, 1999).

Las especies animales susceptibles a la intoxicación natural por esta planta son el bovino, porcino, jabalí y equino, mientras que en forma experimental ha sido reproducida en conejos, roedores y aves (Colvin *et al.*, 1986; Tasaka *et al.*, 2000; Marín 2010; Silva *et al.*, 2011). Los principios activos de la planta pertenecen a distintos grupos, incluyendo alcaloides, albúmina tóxica, N-metil morfina y oxi-metil-antraquinonas; sin embargo, el componente miotóxico no ha sido identificado (Tokarnia *et al.*, 2012).

Es una de las plantas tóxicas más importantes de interés veterinario por ser considerada como contaminante de raciones destinadas al consumo animal (Barros *et al.*, 1999). La intoxicación ocurre cuando los animales ingieren cereales o heno mezcladas con hojas y tallos, pero principalmente con semillas de *S. occidentalis* (Oliveira-Filho *et al.*, 2013).

El curso de la intoxicación en animales varía desde una presentación aguda a crónica, dependiendo de la cantidad de semillas consumidas (Tokarnia *et al.*, 2012); la sintomatología puede comenzar con una diarrea hasta presentar trastornos locomotores, acompañados de alteraciones en músculos esqueléticos, hígado, riñón, corazón y sistema nervioso central (Vashishtha *et al.*, 2009; Mussart *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta la amplia distribución de *Senna occidentalis* en la Región Nordeste de Argentina, y que la producción porcina en esta zona se realiza a pequeña y mediana escala bajo sistemas extensivos y semi-intensivos, los cuales hacen indispensables el aprovechamiento de la oferta forrajera disponible, el objetivo del presente trabajo fue reproducir experimentalmente la intoxicación por consumo de vainas y semillas de *S.*

*occidentalis* en porcinos, así como describir la sintomatología, modificaciones enzimáticas y hallazgos microscópicos a nivel muscular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Plantas de *Senna occidentalis* (Figura 1) fueron recolectadas en marzo de 2015 en el Departamento Capital de la Provincia de Corrientes, Argentina. Posteriormente, vainas y semillas fueron seleccionadas y almacenadas hasta su utilización. La planta fue identificada por el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), con código CTES-540.

Las vainas y semillas de *Senna occidentalis* fueron molidas y mezcladas con alimento balanceado comercial, confeccionándose una ración conteniendo 10% de la planta tóxica. La cantidad de alimento suministrado se calculó a razón del 3% del peso corporal y la ración fue ofrecida dos veces al día.

### Animales

Se emplearon seis cerdos de 45 días de edad, con un peso promedio de  $22.38 \pm 0.32$  kg. Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos. El grupo tratado conformado por animales alimentados con una ración de alimento balanceado conteniendo 10% de vainas y semillas de *S. occidentalis* durante 30 días ( $n=3$ ) y el grupo control ( $n=3$ ) alimentado únicamente con balanceado comercial. Ambos grupos recibieron agua *ad libitum*. Los animales fueron alojados en jaulas individuales de 2.75 m<sup>2</sup>. Todos los procedimientos de este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE (Protocolo 0068).

El consumo de alimento y la exploración clínica fueron registrados diariamente. El pesaje individual se hizo semanalmente; asimismo, se extrajo sangre, con y sin anticoagulante, de la vena cava craneal previo al sacrificio para análisis séricos y hemograma. A partir de muestras de suero se determinó la actividad de la CPK (creatina fosfoquinasa) a través del método UV optimizado (IFCC) en un analizador automatizado InCCA. Para ello se utilizaron reactivos comerciales Wiener® según las condiciones de reacción establecidas por el fabricante.

### Análisis Histopatológicos

A los 30 días de iniciada la experiencia, momento que los animales presentaron signos severos de intoxicación, se procedió a la eutanasia y necropsia de los animales. Los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico al 26% (100 mg/kg, vía endovenosa). En la necropsia se obtuvieron muestras de diafragma y de los grupos musculares extensores, flexores, abductores y aductores de miembros pelvianos y torácicos, así como de músculo cardíaco. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% y procesadas según la técnica histológica clásica para bloques parafinados, con secciones de 5 µm y teñidas con Hematoxilina-Eosina y Tricrómica de Gomori.

### Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Secciones de tejidos musculares fueron prefijados en glutaraldehído 2.5% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.4 y posteriormente en tetróxido de osmio 1% en buffer fosfato 0.2M pH 7.4 y embebido en resina epoxy (resina). Se efectuaron cortes semifinos y se tiñeron con azul de toluidina 1%, para luego obtener cortes ultrafinos teñidos con acetato de uranilo 2% y ser observados en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL EM 1200EX II, Tokyo, Japón).



Figura 1. *Senna occidentalis*, Corrientes, Argentina

### Análisis Estadístico

Los valores fueron expresados con sus medias  $\pm$  desviación estándar (DE). Los datos fueron analizados estadísticamente por análisis de una vía seguido del test de Student. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó disminución en la ganancia diaria de peso en los cerdos durante las tres primeras semanas de recibir el alimento con *S. occidentalis* ( $0.23 \pm 0.05$  vs.  $0.44 \pm 0.06$  kg/día en el grupo control;  $p < 0.05$ ). Luego, los animales intoxicados presentaron pérdida de peso ( $-0.32 \pm 0.07$  kg/día) durante la última semana. Es así, que el grupo que recibió *S. occidentalis* finalizó el ensayo con  $24.80 \pm 0.28$  kg/animal, a diferencia del grupo control que finalizó con un peso de  $35.70 \pm 1.82$  kg/animal ( $p < 0.05$ ). Estos resultados coinciden con diversos autores, quienes indican que la adición de semillas de *S. occidentalis* en la ración diaria afecta negativamente la ganancia de peso corporal (Rodrigues *et al.*, 1993; Vashishtha *et al.*, 2009).

La presencia de diarrea fue un signo clínico inicial, mientras que la anorexia fue el último signo clínico observado. Adicionalmente, los animales intoxicados presentaron signos clínicos relacionados con trastornos de la locomoción, tales como ataxia y temblores musculares, principalmente a nivel de las extremidades posteriores, letargia y presencia de xifosis. Los animales se mostraron reacios a moverse y presentaron recumbencia esternal o lateral. Finalmente, cuando los animales eran forzados a mantenerse de pie, permanecían con sus extremidades posteriores apoyadas una sobre otra. Los cerdos fueron sacrificados el día 30. Varios autores reportaron signos similares de intoxicación en diferentes especies animales intoxicados con *S. occidentalis* (Graziano *et al.*, 1983; Barros *et al.*, 1999; Sant'Ana *et al.*, 2011; Mussart *et al.*, 2013). La sintomatología observada en los animales varió en progresión y severidad con respecto a otras intoxicaciones naturales y experimentales con *Senna*, posiblemente debido a la concentración de la planta consumida en la ración.

La intoxicación por *S. occidentalis* en los cerdos causó elevación significativa de la actividad de la enzima creatina fosfoquinasa (CPK) en comparación con el grupo de animales control (Cuadro 1;  $p < 0.05$ ), mientras que el hemograma no reveló alteraciones

Cuadro 1. Valores de la enzima creatina fosfoquinasa (CPK) en cerdos intoxicados con 10% de *Senna occidentalis* en la ración diaria

Semana	Control	Tratado
1	$37.5 \pm 3.5^a$	$43.0 \pm 8.5^a$
2	$282 \pm 53.7^a$	$839 \pm 182^b$
3	$419 \pm 43.8^a$	$2,032 \pm 125^b$
4	$507 \pm 79.2^a$	$12,625 \pm 3,385^b$

<sup>a,b</sup> Superíndices diferentes dentro de semanas indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

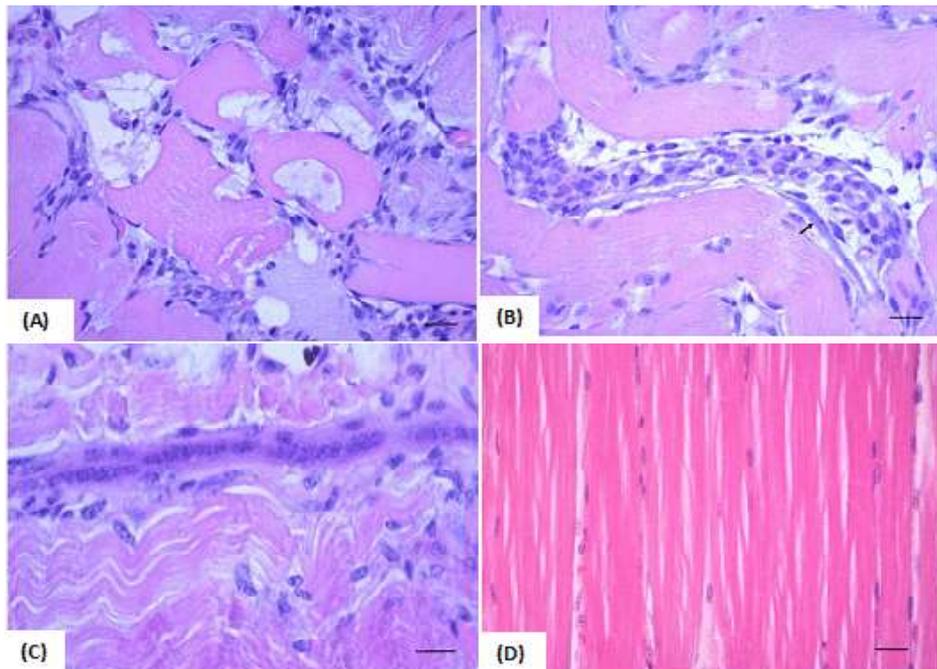


Figura 2. Microscopía óptica. Secciones histológicas del músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con 10% de *Senna occidentalis* en la ración diaria (A-C) y de un cerdo control (D), teñidos con Hematoxilina-Eosina. A) Se observa segmentos de fibras musculares fragmentados, tumefactos y eosinofílicos, con infiltración de macrófagos. B) Nótese los macrófagos eliminando restos necróticos de un segmento de fibra y células miosatélites (flecha). (C) Se muestra un segmento de fibra en regeneración y miofibras de diámetro pequeño con citoplasma basófilo y una hilera interna de núcleos centrales (barra = 20  $\mu\text{m}$ )

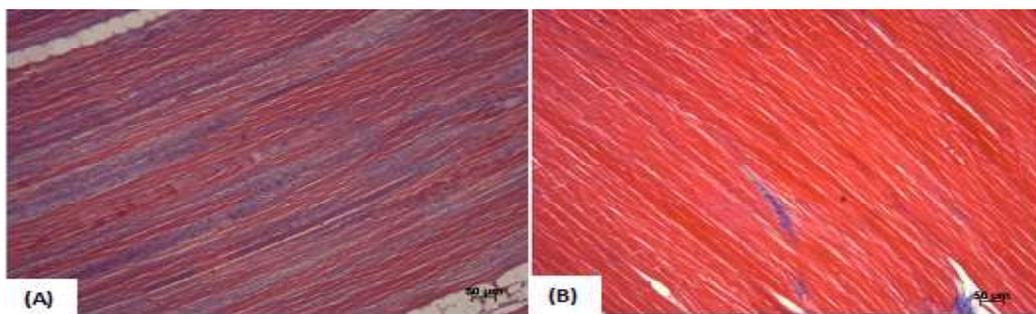


Figura 3. Microscopía óptica. Secciones histológicas de músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con 10% de *Senna occidentalis* en la ración diaria (A) y de un cerdo control (B), teñidas con Tricrómica de Gomori. Se evidencia fibrosis intersticial acompañando a la necrosis de fibras e infiltración de macrófagos (A) (barra = 50  $\mu\text{m}$ )

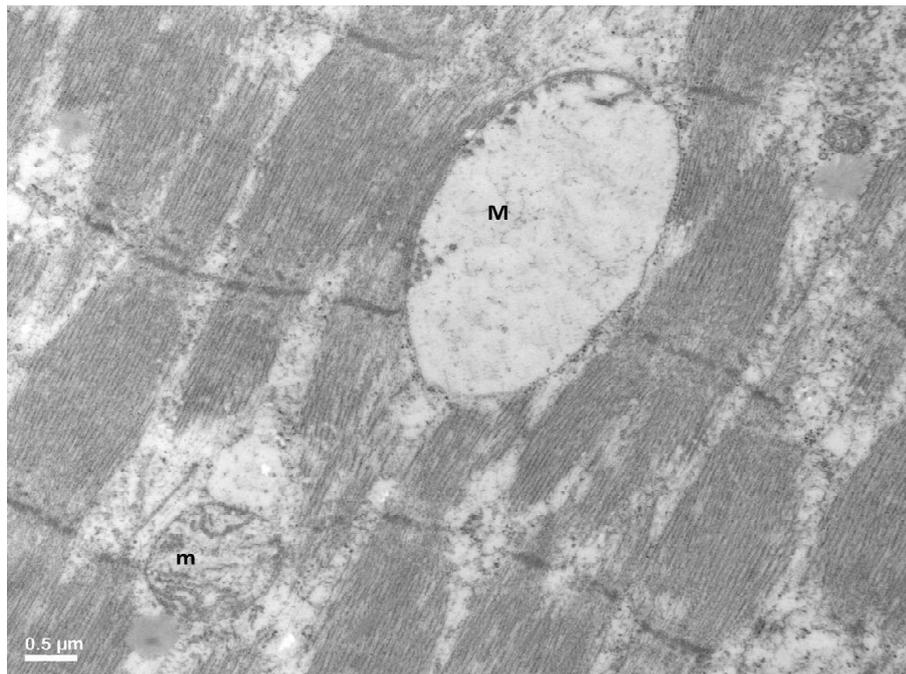


Figura 4. Microscopía electrónica del diafragma correspondiente a un cerdo intoxicado con 10% de *Senna occidentalis* en la ración diaria. Se observa mitocondrias anormalmente agrandadas y vacías (M) y otras con destrucción de las crestas internas (m). X 25 000

significantes (datos no mostrados). Este hallazgo no ha sido previamente reportado en cerdos intoxicados con *Senna* (Colvin *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1993); sin embargo, se ha reportado incremento en las actividades séricas de AST y CPK en otras especies animales intoxicados con esta planta (Marin 2010; Sant'Ana *et al.*, 2011; Oliveira-Filho *et al.*, 2013). Es sabido que la enzima CPK es uno de los indicadores de daño muscular que complementa el diagnóstico clínico (González y Silva, 2006). La detección precoz de la actividad incrementada de la enzima puede resultar de valor diagnóstico en la intoxicación accidental por *S. occidentalis*.

Los hallazgos macroscópicos evidenciados en músculos esqueléticos consistieron en leves cambios de coloración caracterizados por áreas pálidas, aunque el color de la orina no presentó cambios, en concordancia con varios autores, quienes aseguran que la mioglobinuria es un signo ausente, discreto o

poco frecuente en la especie porcina intoxicada con *Senna* (Martins *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1993). Sin embargo, este signo es frecuente en rumiantes (Carmo *et al.*, 2011; Campos, 2014).

Los hallazgos histopatológicos a nivel de músculo esquelético consistieron en necrosis coagulativa segmentaria multifocal con escasos procesos regenerativos y fibrosis multifocal. Los segmentos necróticos se observaron tumefactos, eosinofílicos, fragmentados y con pérdida de núcleos (cariolisis) (Figura 2A). Algunos de los segmentos necróticos estaban infiltrados de macrófagos (Figura 2B) y otros estaban remplazados por miofibras de menor diámetro, con citoplasma basofílico y núcleos centrales dispuestos en fila (mioblastos) (Figura 2C), a diferencia de los animales controles (Figura 2D). Algunos de estos cambios histológicos fueron descritos en otras especies animales intoxicadas con *Senna* spp, los cuales consistieron en lesio-

nes degenerativas y necróticas, juntamente con procesos regenerativos en la musculatura esquelética, identificada como miopatía polifásica multifocal (Herbert *et al.*, 1983; Martins *et al.*, 1986; Colvin *et al.*, 1986; Irigoyen *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1993; Carmo *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se observó abundante fibrosis, reemplazando al tejido muscular, evidenciada mediante la tinción especial de Tricrómica de Gomori (Figura 3A). Este tipo de lesión no fue observada en los animales del grupo control (Figura 3B). Este hallazgo no ha sido reportado a este nivel; sin embargo, ha sido demostrado en tejido cardíaco de bovinos intoxicados naturalmente (Carmo *et al.*, 2011).

A través de la MET se pudo observar a nivel del músculo esquelético diferentes grados de degeneración mitocondrial. Algunas se encontraban dilatadas con pérdidas de algunas crestas y otras se hallaban vacías por la pérdida total de las crestas. Asimismo, a nivel del músculo diafragmático se observó pérdida de segmentos de miofibrillas, visualizándose miofilamentos interrumpidos y aumento de detritos a nivel del sarcoplasma (Figura 4), no habiéndose reportado con anterioridad el daño ultraestructural a nivel mitocondrial en el cerdo. Según Cheville (2009), el daño mitocondrial es la lesión estructural primaria en los animales intoxicados con *S. occidentalis*, por lo que consecuentemente se produce la degeneración miofibrillar, necrosis de miocitos y falla cardíaca congestiva. En el presente trabajo no se observó cambios histológicos a nivel del músculo cardíaco; sin embargo, y en concordancia con otros autores, se observó marcada miodegeneración a nivel de músculo esquelético. Por otro lado, las lesiones halladas en el diafragma podrían causar un trastorno respiratorio y la muerte del animal (Barth *et al.*, 1994).

## CONCLUSIÓN

El presente trabajo confirma el efecto miotóxico crónico de *Senna occidentalis* sobre el cerdo, observándose mayor presencia de fibrosis como proceso de reparación muscular.

## LITERATURA CITADA

1. **Barth AT, Kommers GD, Salles MS, Wouters F, De Barros CS. 1994.** Coffee Senna (*Senna occidentalis*) poisoning in cattle in Brazil. *Vet Hum Toxicol* 36: 541-545.
2. **Barros CSL, Iiha MRS, Bezerra Junior RS, Langohr IM, Kommers GD. 1999.** Intoxicacao por *Senna occidentalis* (Leg. Caesalpinoideae) em bovinos em pastoreio. *Pesq Vet Bras* 19: 68-70. doi: 10.1590/S0100-736X1999000200003
3. **Campos ÉM. 2014.** Intoxicação experimental por *Senna occidentalis* e *Senna obtusifolia* em ovinos. Tesis de Médico Veterinario. Brasil: Universidade Federal de Campina Grande. 38 p.
4. **Carmo P, Irigoyen LF, Lucena RB, Figuera RA, Kommers GD, Barros CS. 2011.** Spontaneous coffee Senna poisoning in cattle: report on 16 outbreaks. *Pesq Vet Bras* 31: 139-146. doi: 10.1590/S0100-736X2011000-200008
5. **Cheville NF. 2009.** Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease. In: Meehan JT (ed). *Myotoxins*. 2<sup>nd</sup> ed. USA: John Wiley & Sons. p 635-651.
6. **Colvin BM, Harrison LR, Sangster LT, Gosser HS. 1986.** *Cassia occidentalis* toxicosis in growing pigs. *J Am Vet Med Assoc* 189: 423-426.
7. **González HD, Silva SC. 2006.** Perfil bioquímico sanguíneo. En: *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2<sup>o</sup> Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 463-516.

8. **Graziano MJ, Flory W, Seger CL, Hebert CD. 1983.** Effects of a *Cassia occidentalis* extract in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Am J Vet Res* 44: 1238-1244.
9. **Hebert CD, Flory W, Seger C, Blanchard RE. 1983.** Preliminary isolation of a myodegenerative toxic principle from *Cassia occidentalis*. *Am J Vet Res* 44: 1370-1374.
10. **Irigoyen LF, Graça DL, Barros CSL. 1991.** Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em equinos. *Pesq Vet Bras* 11: 35-44.
11. **Marin RE. 2010.** Miopatía tóxica en bovinos asociada al consumo de *Cassia occidentalis* en el norte de Salta. *Vet Arg* 27: 210-218.
12. **Martins E, Martins VMV, Riet-Correa F, Soncini RA, Paraboni SV. 1986.** Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leguminosae) em suínos. *Pesq Vet Bras* 6: 35-38.
13. **Mussart NB, Koza GA, Lértora J, Álvarez Chamale GM, Coppo JA. 2013.** Intoxicación por «cafetillo» (*Cassia occidentalis*) en bovinos del nordeste argentino. *Rev Vet* 24: 138-143.
14. **Oliveira-Filho JP, Cagnini DQ, Badial PR, Pessoa MA, Del Piero F, Borges AS. 2013.** Hepatoencephalopathy syndrome due to *Cassia occidentalis* (Leguminosae, Caesalpinioideae) seed ingestion in horses. *Equine Vet J* 45: 240-244. doi: 10.1111/j.2042-3306.2012.00599.x
15. **Rodrigues U, Riet-Correa F, Mores N. 1993.** Intoxicação experimental em suínos com baixas concentrações de *Senna occidentalis* (Leg. Caes.) na racão. *Pesq Vet Bras* 13: 57-66.
16. **Sala JM, Cape G. 2014.** Intoxicación de bovinos con cafetillo en el nordeste argentino. Serie técnica N.º 506. INTA. [Internet]. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_intoxicacin\\_de\\_bovinos\\_con\\_cafetillo\\_en\\_el\\_norde.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_intoxicacin_de_bovinos_con_cafetillo_en_el_norde.pdf)
17. **Sant'Ana FJ, Garcia EC, Rabelo RE, Ferreira Júnior CDS, Freitas Neto AP, Verdejo AC. 2011.** Spontaneous poisoning by *Senna occidentalis* in wild boars (*Sus scrofa ferus*) in Goiás, Brazil. *Pesq Vet Bras* 31: 702-706. doi: 10.1590/S0100-736X2011000800012
18. **Silva MG, Aragão TP, Vasconcelos CF, Ferreira PA, Andrade BA, Costa IM, Costa-Silva J, et al. 2011.** Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 136: 341-346.
19. **Tasaka AC, Weg R, Calore EE, Sinhorini IL, Dagli MLZ, Haraguchi M, Górniak SL. 2000.** Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. *Vet Res Commun* 24: 573-582.
20. **Tokarnia CH, Brito M, Barbosa JD, Peixoto PV, Dobereiner J. 2012.** Plantas que causam lesões localizadas no sistema nervoso central. In: *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção*. 2º ed. Rio de Janeiro: Ed Helianthus. p 253-258.
21. **Vashishtha VM, John TJ, Amod Kumaret. 2009.** Clinical & pathological features of acute toxicity due to *Cassia occidentalis* in vertebrates. *Indian J Med Res* 130: 23-30.