

Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*¹

Danielle A.N. Pessoa^{2*}, Layze C.A. Silva², José R.G. Lopes², Meire M.S. Macêdo², Felício Garino Jr², Sérgio S. Azevedo² e Franklin Riet-Correa²

ABSTRACT.- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Lopes J.R.G., Macêdo M.M.S., Garino Jr F., Azevedo S.S. & Riet-Correa F. 2015. [Resistance to poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats induced by ruminal inoculation of the bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus*.] Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(2):125-128. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: danipessoavet@gmail.com

In Brazil is estimated that poisoning of livestock by sodium monofluoroacetate (MFA) containing plants causes the death of about 500.000 cattle per year. The ruminal inoculation of bacteria that degrade MFA has been proposed as a way to prevent the poisoning. This study aimed to evaluate in goats resistance to the MFA-containing plant *Amorimia septentrionalis* induced by ruminal inoculation of the bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus*. Twelve goats, without previous contact with MFA-containing plants, were divided into two groups of six animals each. In group 1, 60ml of a mixture of the two bacteria was inoculated every day for 10 days into each goat. In group 2, the goats did not receive the bacteria. At the 10th day of inoculation, *A. septentrionalis* began to be administered daily at a dose of 5g/kg body weight to both groups. The administration was interrupted in each goat after first clinical signs of poisoning were observed. The goats of group 1 showed clinical signs 5.83±2.56 days after the administration of the plant, what differed significantly ($p=0.037$) from goats of group 2, that showed clinical signs 2.67±0.52 days after the beginning of ingestion. The amount of *A. septentrionalis* ingested by inoculated goats (28.83±12.97g/kg) to cause clinical signs was significantly greater ($p=0.025$) than the amount ingested by the non-inoculated (12.03±3.65) goats to cause clinical signs and was also statistically different between the groups. We concluded that the intraruminal administration of *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus* increases the resistance to poisoning by MFA-containing plants.

INDEX TERMS: Sodium monofluoroacetate, poisoning plants, resistance to poisoning, dehalogenases, *Amorimia septentrionalis*, *Pigmentiphaga kullae*, *Ancylobacter dichloromethanicus*, goats.

RESUMO.- No Brasil, estima-se que as intoxicações por plantas tóxicas que contêm monofluoroacetato de sódio (MFA) causam a morte de aproximadamente 500.000 bovinos

ao ano. A inoculação ruminal de bactérias que degradam MFA tem sido proposta como uma forma de prevenir a intoxicação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em caprinos, a resistência ao MFA presente em *Amorimia septentrionalis*, induzida por inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. Doze caprinos, que nunca tiveram contato prévio com plantas que contêm MFA, foram divididos em dois grupos, com seis animais cada. No grupo 1, 60 mL de uma

¹ Recebido em 26 de janeiro de 2015.

Aceito para publicação em 12 de fevereiro de 2015.

² Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. *Autor para correspondência: danipessoavet@hotmail.com

mistura das duas bactérias foi inoculada, diariamente, durante 10 dias em cada caprino. No grupo 2, os caprinos não receberam as bactérias. A partir do 10^o dia de inoculação, *A. septentrionalis* foi administrada, diariamente, na dose de 5g/kg de peso vivo, sendo interrompida em cada animal após a observação dos primeiros sinais clínicos da intoxicação. Os caprinos do grupo 1 apresentaram sinais clínicos 5,83±2,56 dias após a administração da planta o que diferiu significativamente ($p=0,037$) dos caprinos do grupo 2, que apresentaram sinais clínicos aos 2,67±0,52 dias. A quantidade de planta ingerida pelos caprinos inoculados (28,83±12,97g/kg) e os não inoculados (12,03±3,65g/kg) para desencadear os sinais clínicos foi, também, estatisticamente diferente entre os grupos ($p=0,025$). Conclui-se que a administração intraruminal de *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus* induz resistência à intoxicação por plantas que contêm MFA.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Monofluoroacetato de sódio, plantas tóxicas, intoxicação por plantas, resistência às intoxicações, dehalogenases, *Amorimia septentrionalis*, *Pigmentiphaga kullae*, *Ancylobacter dichloromethanicus*, caprinos.

INTRODUÇÃO

A intoxicação de animais domésticos por plantas que possuem monofluoroacetato de sódio (MFA), incluindo *Amorimia* spp., *Palicourea* spp., e *Arrabidaea* spp. é responsável, anualmente, por aproximadamente 410.380 a 877.881 mortes de bovinos, o que representa 50% das mortes ocasionadas por todas as plantas tóxicas no Brasil, estimadas em 820.761 e 1.755.763 bovinos (Pessoa et al. 2013). *Amorimia septentrionalis*, anteriormente identificada como *Amorimia (Mascagnia) rigida* (Duarte et al. 2014), popularmente conhecida por tinguí é uma das plantas tóxicas mais importantes da Paraíba (Medeiros et al. 2002, Vasconcelos et al. 2008ab).

O controle desse tipo de intoxicação pode ser realizado por meio da detoxificação do MFA, no rúmen, por bactérias produtoras de dehalogenases capazes de degradar esse composto (Gregg et al. 1998), que podem ser isoladas do rúmen de animais, do solo e de plantas (Twigg & Socha 2001, Camboim et al. 2012ab, Davis et al. 2012). As dehalogenases produzidas pelas bactérias atuam por meio da clivagem da ligação carbono-halogênio e no caso do MFA, a dehalogenase fluoroacetato e a L-2-haloácido dehalogenase são capazes de atuar sobre a ligação carbono-flúor, ocasionando a inativação desse composto tóxico (Fetzner & Lingers 1994, Chan et al. 2010).

Na Paraíba, as bactérias que degradam MFA, *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* foram isoladas do rúmen de caprinos criados em áreas livres de plantas que contêm MFA (Camboim et al. 2012b).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da utilização de bactérias degradadoras de MFA, isoladas do rúmen de caprinos, na detoxificação ruminal do MFA presente em *A. septentrionalis*, indicando uma possível forma de controle para a intoxicação por essa planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Amorimia septentrionalis foi coletada no município de Teixeira (S 7°12.24' O 37°15.11'; elevação 749m), localizado no estado da Paraíba, no mesmo lugar utilizado por Duarte et al. (2014) para coletar planta com objetivo de induzir resistência à intoxicação em caprinos.

Foram utilizados 12 caprinos, mestiços, com idades de 1 a 3 anos, pesando de 20 a 40 kg, todos sem histórico de intoxicação ou contato prévio com *A. septentrionalis*, divididos em dois grupos. O Grupo 1, foi composto por seis animais que receberam, durante 10 dias, por administração oral, 60 mL de uma solução contendo as bactérias *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*, isoladas de rúmen de caprino (Camboim et al. 2012b).

Para obtenção dessa solução, as bactérias foram semeadas em ágar nutriente e ágar sangue de ovino desfibrinado a 5%, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24-48 horas. Cada bactéria era diluída em solução fisiológica a 0,9% estéril até que atingisse o grau 1 da escala de Mac Farland. O inóculo para cada animal era preparado misturando 50 mL da solução de cada bactéria, de onde se retirava os 60 mL para posterior inoculação (Gregg et al. 1998).

No décimo dia de inoculação, iniciou-se a administração diária de folhas verdes da planta na dose de 5g/kg. Essa dose foi determinada após a administração previa a dois caprinos que adoeeceram após dois dias de ingestão da planta. Outros dois caprinos que receberam, diariamente, 3g/kg de *A. septentrionalis* durante 15 dias, não apresentaram sinais clínicos. A planta era oferecida de forma voluntária aos caprinos, e os que não comiam recebiam a planta mediante a administração de pequenas quantidades da mesma diretamente em suas bocas.

No grupo 2, controle, constituído, também, por seis caprinos, não foram inoculadas as bactérias e a planta foi oferecida da mesma forma que aos animais do grupo 1. Em razão de os sinais clínicos serem desencadeados pelo exercício, logo após a administração da planta, todos os caprinos eram estimulados a se exercitar durante 10 minutos. Antes e depois de oferecer a planta, a temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais foram mensurados e modificações comportamentais foram observadas. Interrompeu-se a administração da planta assim que os animais demonstraram sinais clínicos de intoxicação.

Amostras de aproximadamente 4mL de sangue, foram coletadas por punção da veia jugular em tubo a vácuo (vacutainer®), sem anticoagulante, antes da primeira administração da planta, a cada 2 dias após a administração da mesma e 15 dias após a última dose. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Eppendorf®, modelo 5804R) a 1600G por 15 minutos para obtenção do soro. As concentrações séricas de creatinina, ureia, albumina, magnésio, cálcio, fósforo e proteínas totais e as atividades séricas de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) foram mensuradas por meio da utilização de kits comerciais (Labtest®). A leitura foi realizada com auxílio de analisador bioquímico semi-automático Bioclin Systems II.

A resistência à intoxicação pela planta foi avaliada pelo tempo para o aparecimento dos sinais clínicos e quantidade de planta consumida para desencadear os mesmos. Os dados foram analisados estaticamente pelo teste não-paramétrico de U de Mann-Whitney, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal (Zar 1999). O programa Bioest 5.3, foi utilizado para as análises, e o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Os sinais clínicos observados nos caprinos intoxicados foram depressão, taquicardia, taquipneia, relutância ao movimento, mugidos, diarreia, incoordenação motora, tremores

Quadro 1. Tempo para início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com bactérias que degradam fluoracetato (grupo 1) e caprinos controle (grupo 2)

	Grupo 1						Grupo 2					
Animais (Nº)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dias para início dos sinais clínicos	8	2	4	8	5	8	3	3	3	2	3	2
Média ± desvio-padrão	5,83±2,56 ^a						2,67±0,52					

^a Diferença estatisticamente significativa com o grupo controle (P<0,05).

Quadro 2. Dose de planta ingerida até o início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com bactérias que degradam fluoracetato (grupo 1) e caprinos controle (grupo 2)

	Grupo 1						Grupo 2					
Animais (Nº)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dose de planta (g/kg) ingerida	40	10	20	40	23	40	15	15	15	8,2	12	7
Média ± desvio-padrão	28,83±12,97 ^a						12,03±3,65					

^a Diferença estatisticamente significativa com o grupo controle (P<0,05).

musculares e ingurgitamento da veia jugular com pulso venoso positivo. Em três animais do grupo 1 os únicos sinais clínicos observados foram taquicardia e ingurgitamento da jugular. O tempo após o início da ingestão em que cada caprino apresentou sinais clínicos foi significativamente maior (p=0,037) no grupo dos caprinos que receberam a bactéria (Quadro 1). A dose de planta ingerida pelos animais inoculados (grupo 1) foi, também, significativamente maior do que a ingerida pelos caprinos do grupo 2 (controle) (p=0,025) (Quadro 2).

Todos os animais se recuperaram dentro de 24 horas após o final da ingestão de *Amorimia septentrionalis*. Somente o caprino 9 do grupo 2 morreu dois dias após o início dos primeiros sinais clínicos da intoxicação. Na necropsia, foram observados coágulos no ventrículo esquerdo. Histologicamente, no rim, pode-se constatar a presença de degeneração hidrópico-vacuolar e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados distais.

Na avaliação da bioquímica sérica dos dois grupos, os valores estavam dentro do normal (Kaneko et al. 2008) e não diferiram entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho comprovam que a inoculação intraruminal das bactérias *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* é capaz de induzir resistência a plantas que contêm monofluoroacetato de sódio (MFA) em caprinos. Possivelmente essa resistência é induzida pela capacidade de adaptação dessas bactérias em ambientes contaminados pelo MFA, permitindo que utilizem essa substância como fonte de carbono e energia (Blümel et al. 2001, Firsova et al. 2009). Resultados semelhantes foram observados por Gregg et al. (1998) que inocularam em ovinos a bactéria ruminal, *Butyrivibrio fibrisolvens* modificada geneticamente com um gene que codifica a produção da enzima fluoroacetato dehalogenase, obtido a partir de uma espécie de *Moraxella*, comprovando que os ovinos inocu-

lados eram resistentes a doses maiores de MFA do que os animais controles.

Estes resultados também se assemelham aos observados por Duarte et al. (2014) em caprinos que receberam, repetidamente, doses não tóxicas de *Amorimia septentrionalis*. Entretanto, em ovinos, a administração de doses não tóxicas de MFA não aumentou a resistência à intoxicação (Santos et al. 2014). Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foi sugerido que havia quatro possibilidades de induzir resistência a intoxicação por plantas que contêm MFA: 1) a administração repetida, por períodos alternados, de doses não tóxicas da planta; 2) a administração de MFA em doses não tóxicas o que permitiria, também, a proliferação de bactérias que tenham atividade de dehalogenases; 3) a administração de outro substrato semelhante a MFA, não tóxico, que estimule a proliferação de bactérias com atividade de dehalogenases; e 4) a administração de bactérias que degradam MFA (Camboim et al. 2012a, 2012b, Oliveira et al. 2013, Santos et al. 2014). Considerando os resultados negativos obtidos pela inoculação de MFA (Santos et al. 2014), assim como o risco e as dificuldades de administrar doses não tóxicas de plantas que contem MFA, fica evidenciado a utilização de bactérias que hidrolisam este composto como uma alternativa viável para conferir resistência a intoxicação. Por outro lado, não se conhece o grau nem a duração da resistência que pode ser adquirida pela inoculação de bactérias, utilizadas isoladamente ou em um consorcio de bactérias.

Novos trabalhos deverão ser realizados para tentar aumentar a resistência e determinar sua duração, utilizando diferentes bactérias por períodos diferentes. Outra variável a ser levada em consideração é a quantidade de planta que os animais ingerem espontaneamente, pois se com a inoculação de bactérias se aumenta a resistência de forma que os animais possam ingerir doses maiores sem adoecer, é provável que a ingestão dessas doses em forma continuada possa aumentar ou manter uma resistência necessária para não ocorrer mortes. Um fato bem conhecido é que animais criados em áreas onde ocorrem plantas que contem MFA são menos susceptíveis que animais criados em áreas onde não ocorrem essas plantas (Silva et al. 2008). Porém, não há o conhecimento se essa resistência é adquirida pela ingestão de doses não tóxicas da planta ou é devido a seleção natural em consequência da morte dos animais susceptíveis.

O rol de bactérias que degradam MFA na resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* é evidenciado, também, por estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, que revelaram ser possível evitar a intoxicação mediante transfaunação de fluido ruminal de caprinos resistentes, que receberam bactérias que degradam MFA e posteriormente *A. septentrionalis*, para caprinos susceptíveis (dados não publicados). Resultados semelhantes foram encontrados por Duarte et al. (2014), que induziram resistência em caprinos por meio de transferência de fluido ruminal de animais resistentes, que receberam doses repetidas não tóxicas de *A. septentrionalis*, para animais susceptíveis.

Os sinais clínicos demonstrados pelos caprinos intoxicados e as lesões histológicas do animal que morreu foram

semelhantes aos relatados anteriormente na intoxicação por *A. septentrionalis* (Vasconcelos et al. 2008a, 2008b, Duarte et al. 2014).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a inoculação ruminal simultânea de *Ancyllobacter dichloromethanicus* e *Pimentiphaga kullae* aumenta a resistência à intoxicação por plantas que contêm monofluoroacetato de sódio.

Agradecimentos.- Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) para o Controle das Intoxicações por Plantas (Proc. CNPq 573534/2008-0).

REFERÊNCIAS

- Blümel S., Mark B., Busse H.J., Kämpfer P. & Stolz A. 2001. *Pimentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. *Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(5):1867-1871.
- Camboim E.K.A., Tadra-Sfeir M.Z., Souza E.M., Pedrosa F.O., Andrade P.P., McSweeney C.S., Riet-Correa F. & Melo M.A. 2012a. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. *Scient. World J.* 2012:149893.
- Camboim E.K.A., Almeida A.P., Tadra-Sfeir M.Z., Junior F.G., Andrade P.P., McSweeney C.S., Melo M.A. & Riet-Correa F. 2012b. Isolation and identification of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. *Scient. World J.* 2012:178254.
- Chan W.Y., Wong M., Guthrie J., Savchenko A.V., Yakunin A.F., Pai E.F. & Edwards E.A. 2010. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbiol. Biotechnol.* 3(1):107-120.
- Davis C.K., Webb R.I., Sly L.I., Denman S.E. & McSweeney C.S. 2012. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum Synergistetes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80(3):671-684.
- Duarte A.L.L., Medeiros R.M.T., Carvalho F.K.L., Lee S.T., Cook D., Pfister J.A., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2014. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* 34(2):220-223.
- Fetzner S. & Lingers F. 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* 58(4):641-685.
- Firsova J., Doronina N., Lang E., Spröer C., Vuilleumier S. & Trotsenko Y. 2009. *Ancyllobacter dichloromethanicus* sp. nov. - a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. *Syst. Appl. Microbiol.* 32(4):227-232.
- Gregg K., Hamdorf B., Henderson K., Kopency J. & Wong C. 1998. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3496-3498.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. Blood analyte reference values in some laboratory animals, p.881-887. In: *Ibid.* (Eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animal.* 6th ed. Academic, Philadelphia. 896p.
- Medeiros R.M.T., Geraldo Neto S.A., Barbosa R.C., Lima E.F. & Riet-Correa F. 2002. Sudden death caused by *Mascagnia rigida* in cattle in Paraíba, Northeastern Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 44(5):286-288.
- Oliveira M.D., Riet-Correa F., Carvalho F.K.L., Silva G.B., Pereira W.S. & Medeiros R.M.T. 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):731-734.
- Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):752-758.
- Santos A.C., Riet-Correa F., Heckler R.F., Lima S.C., Silva M.L., Rezende R., Carvalho N.M. & Lemos R.A.A. 2014. Falha na administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio na prevenção da intoxicação por esta substância em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):649-654.
- Silva I.P., Lira R.A., Barbosa R.R., Batista J.S. & Soto-Blanco B. 2008. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 75(2):229-233.
- Twigg L.E. & Socha L.V. 2001. Defluorination of sodium monofluoroacetate by soil microorganisms from central Australia. *Soil Biol. Biochem.* 33(2):227-234.
- Vasconcelos J.S., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T. & Dantas A.J.A. 2008a. Mortes súbitas causadas por *Palicourea aeneofusca* e *Mascagnia rigida* na Zona da Mata Paraibana. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):457-460.
- Vasconcelos J.S., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T. & Dantas A.J.A. 2008b. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):521-526.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis.* 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 929p.