



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Especialización en Producción y Sanidad Porcina

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

TÍTULO: ALTERACIONES MUSCULARES PRODUCIDAS POR LA INTOXICACIÓN
EXPERIMENTAL CON VAINAS Y SEMILLAS DE *Senna occidentalis* EN CERDOS

AUTORA: MV CHILESKI, Gabriela Soledad

DIRECTOR: Dr. BOGADO, Edgar Fabián

CO-DIRECTORA: Dra. QUIROGA, Alejandra

AÑO 2021

*A Marcos y Julio Silva,
por quienes todos los esfuerzos valen la pena.*

*A la memoria del Dr. Elvio Ríos,
de quién me quedan las mejores enseñanzas.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Marcos y Julio Silva, por el amor incondicional que me contiene cada día.

A mi papá, hermanos y tías, por su apoyo ilimitado a pesar de las distancias.

A Teresa Rivero y Adela Alvarenga, dos mujeres que siempre estaban dispuestas a acompañarme, con mi hijo a cuestas, para poder llevar a cabo este objetivo.

A mis directores, les agradezco por la aceptación, la confianza y el apoyo.

A la Dra. Luciana Cholich, quien con incondicional predisposición, aportó sus valiosas contribuciones en la escritura de este trabajo.

Al Dr. Nicolás García y cada una de las becarias, quienes con su ayuda hicieron muy amena la etapa experimental.

Al Lic. Walter Medina, perteneciente al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONNE-CONICET), por la identificación taxonómica de la planta.

*A la Dra. Ana María Torres de la Facultad de Ciencias Exactas (UNNE), por abrirme las puertas de su laboratorio para llevar a cabo el análisis fitoquímico de *Senna occidentalis*.*

A la Dra. Norma Mussart y al equipo del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Escuela Veterinario FCV - UNNE, por la realización de los análisis clínicos.

Al Dr. Javier Lertora, quien realizó los estudios histopatológicos.

A los docentes y organizadores de la Especialización en Producción y Sanidad Porcina de la FCV – UNLP, especialmente a la Dra. Sara William y la Dra. Mariana Machuca, quienes siempre me hicieron sentir como en casa en cada uno de mis viajes.

A mis evaluadores, la Dra. Pamela Teibler, el Dr. Pedro Zeinstegeer y el Dr. Juan Francisco Micheloud. Es un honor para mí ser evaluada por un jurado del más alto nivel académico y humano.

Agradezco profundamente a las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Nordeste, por permitirnos a sus docentes generar conocimiento a través de nuestras formaciones de posgrado; y a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata por abrirme las puertas a fin de poder perfeccionarme.

..y a todas aquellas personas que contribuyeron a que esto se haga posible

..mi gratitud sincera a todos ustedes.

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos	ii
Índice	iv
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xi
Palabras claves	xi
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
HIPÓTESIS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
MARCO TEÓRICO	5
METODOLOGÍA	12
1. Planta	12
1.1 Recolección, identificación taxonómica y almacenamiento	12
1.2 Análisis fitoquímico	14
1.2.1 Obtención de las muestras	14
1.2.2 Obtención de los extractos	14
1.2.3 Fitoquímica	14
1.2.3.1 Alcaloides: test de Dragendorf (ioduro de bismuto y potasio)	14
1.2.3.2 Fenoles: reacción con FeCl ₃	14
1.2.3.3 Esteroides o triterpenos: Reacción de Liebermann-Burchard	14
1.2.3.4 Taninos: reacción con gelatina/NaCl – placa o tubo-	14
1.2.3.5 Flavonoides: reacción de Shinoda	14
1.2.3.6 Aminoácidos	14
1.2.3.7 Antranoides: Quinonas – reacciones en tubo-	14
1.2.3.8 Glucósidos cardiotónicos: Reactivo de Raymond-Marthoud	15

INDICE

	Página
2. Ensayos de toxicidad en animales	15
3. Preparación de la ración tóxica y análisis del alimento	15
4. Evaluación clínica y del peso corporal	18
5. Evaluación del hemograma y perfil enzimático muscular	18
6. Evaluación post mortem	18
6.1. Evaluación histopatológica	19
6.2. Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión	19
7. Análisis estadístico	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
1. Planta	20
1.1 Análisis fitoquímico	20
3. Análisis del alimento	21
4. Evaluación clínica y del peso corporal	21
5. Evaluación del hemograma y perfil enzimático	24
6. Evaluación post mortem	25
6.1. Evaluación histopatológica	25
6.2. Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión	
(MET)	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Análisis fitoquímico de distintas partes de <i>S. occidentalis</i>	21
2	Comparación de los pesos de los animales experimentales (Kg).	24
3	Valores de la enzima CPK en suero de cerdos intoxicados con 10 % de frutos de <i>S. occidentalis</i> en la ración diaria	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Senna occidentalis</i> . Corrientes, Argentina	13
2	Vainas de <i>Senna occidentalis</i> . Corrientes, Argentina	13
3	Vainas y semillas de <i>S. occidentalis</i> molidas	16
4	Triturador Forrajero TRAPP TRF 400®	17
5	Mezclado del alimento	17
6	Cerdo afectado por el consumo de <i>Senna occidentalis</i> . Presenta dificultad para incorporarse.	22
7	Cerdo afectado por el consumo de <i>Senna occidentalis</i> . Estación forzada con las extremidades posteriores apoyadas una sobre otra.	23
8a, b,c y d	Microscopia óptica. Secciones histológicas del músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con 10 % de <i>Senna occidentalis</i> en la ración diaria (A-C) y de un cerdo control (D), teñidos con Hematoxilina-Eosina. A) Se observan 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 (D) Fibras musculares esqueléticas sin lesiones (barra = 20 µm).	27
9a y b	Microscopia óptica. Secciones histológicas de músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con 10 % de <i>Senna occidentalis</i> en la ración diaria (A) y de un cerdo control (B), teñidas con Tricrómico de Gomori. A) Se evidencia fibrosis intersticial en los animales intoxicados . B) Tejido muscular sin lesiones. (barra = 50 µm)	28

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
10a y b	Microscopía Electrónica de Transmisión de músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con <i>Senna occidentalis</i> (A) y a un cerdo control (B). A) Se observan las miofibrillas con separación y se identifican dos mitocondrias (flechas), con marcada tumefacción, vacuolización y pérdida completa de las crestas (cristolisis). (barra = 0,2 μ m) B) Tejido muscular con estructura normal, mitocondrias (flechas) sin alteraciones. (barra = 500 nm).	29

ABREVIATURAS

- **µm:** micras
- **°C:** Grados Celsius
- **ANOVA:** Análisis de la Varianza
- **ALT:** alanin aminotransferasa
- **AST:** Aspartato aminotransferasa
- **ALP:** fosfatasa alcalina
- **Ca:** calcio
- **CHCM:** Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
- **CHE:** butirilcolinesterasa
- **cm:** centímetros
- **CONICET:** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
- **col:** colaboradores
- **CPK:** Creatininfosfokinasa
- **CTES:** Corrientes
- **DS:** Desvío Estándar
- **EEUU:** Estados Unidos
- **ERAGIA:** Escuela Regional de Agricultura Ganadería e Industrias Afines
- **FeCl₃:** cloruro férrico
- **GC:** Grupo Control
- **GT:** Grupo Tratado
- **h:** horas
- **HCM:** Hemoglobina Corpuscular Media
- **IBONE:** Instituto de Botánica del Nordeste
- **Kg:** kilogramos
- **m:** metros
- **m²:** metros cuadrados
- **mM:** milimolar
- **M:** Molar
- **MAGyP:** Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
- **MET:** Microscopía Electrónica de Transmisión
- **n:** número
- **Nº:** Número
- **NaCl:** cloruro de sodio

- **NaOH:** hidróxido de sodio
- **NEA:** Nordeste Argentino
- **nm:** nanómetros
- **p:** probabilidad
- **pH:** potencial de hidrógeno
- **RAG:** relación albúmina/globulina
- **RBC:** glóbulos rojos
- **RYR-1:** receptor de rianodina 1
- **S:** semillas
- **S. occidentalis:** *Senna occidentalis*
- **SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- **SIGSA:** Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **UI/L:** Unidades Internacionales por Litro
- **UNNE:** Universidad Nacional del Nordeste
- **UV:** ultravioleta
- **V: vainas**
- **V+S:** vainas con semillas
- **VCM:** Volumen Corpuscular Medio

RESUMEN

Se describen los hallazgos clínicos y patológicos de la intoxicación 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, recibiendo alimento comercial. Los animales intoxicados mostraron letargia, ataxia, temblores musculares, pérdida de peso y decúbito. La enzima creatina fosfoquinasa aumentó significativamente en los cerdos intoxicados con *S. occidentalis* ($p < 0.05$). La histopatología reveló que los cerdos intoxicados sufrieron 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 CLAVES: necrosis muscular; planta tóxica; producción porcina.

ABSTRACT

xi

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 the other group remained as a control group. The intoxicated animals showed lethargy, ataxia, muscular tremors, weight loss and recumbency. The enzyme creatine phosphokinase increased significantly in pigs intoxicated with *S. occidentalis* ($p < 0.05$). The histopathology revealed that the intoxicated pigs 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.

KEYWORDS: muscular necrosis; toxic plant; pig production.

INTRODUCCIÓN

Senna occidentalis (L.) Link es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia *Leguminosae* y subfamilia *Caesalpinioideae*, conocida vulgarmente en el Norte Argentino como “cafetillo, falso café, pico de pájaro, café salvaje y hierba hedionda” (Salas y Caspe, 2014). Puede ser diferenciada de otras especies del género por el aspecto del fruto, el cual en *S. occidentalis* crece con la extremidad libre hacia arriba (Tokarnia y col., 2012). Es una planta ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde habita áreas con pastos bajos, suelo fértil, campos cultivados y con alta carga animal (Barros y col., 1990). Varias especies son sensibles a la toxicidad de esta especie. Naturalmente se han registrado caso en bovinos, suinos y equinos (Colvin y col., 1986; Martins y col., 1986; Irigoyen y col., 1991). En forma experimental la intoxicación ha sido reproducida en estas especies, además de otras como conejos, roedores y aves (Colvin y col., 1986; Martins y col., 1986; Irigoyen y col., 1991; Rodrigues y col., 1993; Cavalieri y col., 1997; Calore y col., 1998; Nakage y col., 2000; Tasaka y col., 2000; Barbosa-Ferreira y col., 2005; Aragao *et al.*, y col., 2009; Vashishtha y col., 2009; Marín, 2010; Barbosa-Ferreira y col., 2011; Carmo y col., 2011; Silva y col., 2011; Oliveira-Filho y col., 2013). Los principios activos de la planta, pertenecen a distintos grupos, desde alcaloides, albúmina tóxica, N-metilmorfina y oxi-metil- antraquinonas; sin embargo el componente miotóxico no ha sido identificado (Tokarnia y col., 2012).

Es una de las plantas tóxicas más importantes de interés veterinario en ciertas regiones (Oudhia, 2008). Un rasgo distintivo de esta especie es que sus semillas pueden contaminar raciones destinadas al consumo animal (Barros y col., 1990). La intoxicación ocurre cuando los animales ingieren cereales o heno mezclados con hojas, tallos y, principalmente, con semillas de *S. occidentalis* (Dollahite y Henson, 1965; Henson y Dollahite, 1966; Mercer, 1967).

El curso en animales intoxicados varía desde una presentación aguda a crónica, dependiendo de la cantidad de planta consumida (Tokarnia y col., 2012); la signología puede comenzar con una diarrea hasta presentar trastornos locomotores, y se acompaña de alteraciones en músculos esqueléticos, hígado, riñón, corazón y SNC (Tokarnia y col., 2000; Albarracín y col., 2008; Vashishtha y col., 2009; Hubinger y col., 2000; Mussart y col., 2013).

Teniendo en cuenta la amplia distribución de *S. occidentalis* en nuestra Región Nordeste existe un riesgo real que los animales de producción ingieran esta planta (Salas y Caspe, 2014). En el caso de los cerdos, la producción porcina en esta zona

se realiza a pequeña y mediana escala bajo sistemas extensivos y semi-intensivos, en los que resulta indispensable el aprovechamiento de la oferta forrajera disponible (Brunori, 2013). En este marco, el objetivo del presente trabajo fue reproducir experimentalmente, en cerdos, la intoxicación con *S. occidentalis*, a partir del consumo del 10 % de vainas y semillas de *S. occidentalis* y describir la signología, las modificaciones enzimáticas y los hallazgos microscópicos a nivel muscular.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En Argentina se registran unas 35 especies de género *Senna* que habitan desde Misiones, Salta y Jujuy hasta Río Negro y Neuquén (Burkat, 1987; Troiani y col., 1994). Todas las especies de *Senna* son tóxicas; sin embargo, *S. occidentalis* y *S. obtusifolia* son consideradas las más problemáticas (Oudhia, 2008).

Existen reportes de intoxicación accidental en animales y humanos por *S. occidentalis* en distintas partes del mundo (Vashishtha y col., 2009). En nuestro país, en el año 2014, se comunicó la ingestión de semillas de *S. occidentalis* por parte de una niña en la provincia de Tucumán, que sufrió una insuficiencia hepática aguda fulminante (Motto y col., 2014). En animales, la intoxicación generalmente se produce por contaminación ocasional de las raciones, debido a que la planta crece entre los cultivos de maíz, sorgo y soja (Barros y col., 1990). A pesar que los cultivos son previamente tratados, pueden resultar contaminados con semillas de *S. occidentalis* dado que estas poseen similar tamaño y densidad que los granos de los cereales mencionados (Tasaka y col., 2000). En el caso de la especie porcina, existen escasos reportes, provenientes de trabajos realizados en Brasil y EE. UU., referidos a la intoxicación experimental con semillas de *S. occidentalis* (Colvin y col., 1986; Martins y col., 1986; Rodrigues y col., 1993).

La producción porcina es una alternativa en nuestra región que viene transitando un camino de oportunidades que llevarán al desarrollo y a la consolidación de esta actividad (Brunori, 2007). La cría de cerdos al aire libre es muy común en nuestro país y en el resto del mundo, caracterizándose por permitir un mejor aprovechamiento de recursos forrajeros naturales, teniendo presente que algunas especies vegetales pueden resultar tóxicas para los animales (Brunori, 2013).

Sobre la base de lo expuesto, resulta de interés profundizar el estudio de las alteraciones musculares en cerdos intoxicados experimentalmente con *S. occidentalis* con el objetivo de aportar conocimiento respecto de las consecuencias de esta intoxicación esta especie, y de contribuir a prevenir posibles intoxicaciones.

HIPÓTESIS

En cerdos, el consumo de vainas y semillas de *S. occidentalis* produce lesiones musculares.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar experimentalmente la intoxicación muscular a partir de una ración conteniendo 10% de vainas y semillas de *Senna occidentalis* empleando el cerdo como modelo experimental.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar mediante un análisis fitoquímico cualitativo los principios activos, a partir de un extracto acuoso elaborado con vainas y semillas de *S. occidentalis*.
- Evaluar la sintomatología, las alteraciones musculares y bioquímicas producidas por la intoxicación.

MARCO TEÓRICO

La actividad pecuaria constituye uno de los principales aportes para la economía de Argentina, donde los animales se crían generalmente bajo un sistema de explotación extensivo, sobre grandes extensiones, bajo campo natural o praderas levemente mejoradas. Para lograr buenos índices productivos y reproductivos en estas condiciones se deben aprovechar para la alimentación especies vegetales autóctonas (Moreno y col., 2009).

La producción porcina en la Argentina representa el 0,09 % de la producción porcina mundial (MAGyP 2012); hoy se estima que el país posee 5.119.438 cerdos (SIGSA – SENASA, 2017). En cuanto a la distribución del stock nacional por regiones, el NEA cuenta con el 11,25 % de dicho stock. La provincia de Corrientes posee un stock total de 84.730 cerdos, repartidos en 5.362 establecimientos, de los cuales el 99,04 % corresponde a productores con hasta 50 madres (SIGSA – SENASA, 2017).

Argentina se caracteriza por su amplia disponibilidad de superficies y por poseer condiciones agro-ecológicas propicias para la crianza de cerdos, respetando el bienestar animal y cuidando el medio ambiente. Posee excelente aptitud en cuanto a suelos, clima y disponibilidad de agua dulce. Ello le permite ser un gran productor de cereales y oleaginosas, principales insumos de la actividad. El rubro alimentación impacta en el costo de producción del cerdo entre el 60 % y el 80 %, similar a las demás regiones productoras del mundo (Papotto, 2006).

Los sistemas de pequeña y mediana escala, totalmente a campo o mixtos, se caracterizan por ser una alternativa de producción adecuada para pequeños productores, dado que permite un mejor aprovechamiento de recursos forrajeros naturales, no obstante debe tenerse presente que algunas especies vegetales pueden resultar tóxicas para los animales (Brunori, 2013). Estos sistemas de producción, como la mayoría de los existentes en Argentina, tienen ventajas y desventajas en contraposición con los sistemas en confinamiento, basados en dietas controladas. Como ventaja exige menor inversión en instalaciones; si se cuenta con buenas pasturas, reduce el costo en la alimentación; destacando el máximo aprovechamiento de los recursos naturales con suplementación de granos (Vieites y col., 1997). Entre las desventajas, se mencionan el uso de un mayor porcentaje de machos (10 a 15 %); mayor pérdida de lechones en el parto dado que las pariciones se producen sin el control del ambiente y con poca intervención del hombre; bajo número de lechones destetados con respecto a otros sistemas de producción. Como otra desventaja está el valor de la tierra, ya que hoy con la mejora en la producción de cultivos la tendencia es utilizar menos superficie destinada a animales y aumentar la superficie cultivada.

Desde el punto de vista sanitario, en los sistemas a campo el manejo es mínimo y la genética es rústica y en relación a la alimentación podemos citar que, como existe una baja disponibilidad de buen forraje en épocas de sequías y temperaturas desfavorables, los animales están obligados a ingerir pastos perennes que se mantienen verdes todo el año o bien que crecen mezclados con el forraje relevante (Vieites y col., 1997). Estos pastos perennes son, no sólo de mala calidad, sino potencialmente tóxicos (Vallejo, 1980). Es así, que las intoxicaciones por plantas pueden constituir un riesgo potencial en estos sistemas. Factores como palatabilidad, hambre, sed, accesibilidad a las plantas tóxicas, variaciones en su toxicidad, entre otras pueden ser determinantes (Tokarnia y col., 2000).

Se puede definir como planta tóxica de interés agropecuario aquella que, cuando es ingerida por los animales domésticos, en condiciones naturales, causa daños a la salud o la muerte (Tokarnia y col., 2000). Las intoxicaciones por plantas, acarrear graves pérdidas económicas en nuestro país debido a pérdidas directas o indirectas. Entre las pérdidas directas se consideran la muerte de animales, la disminución de índices productivos en los animales sobrevivientes, la disminución de la eficiencia de conversión y la ganancia diaria de peso, disminución de índices reproductivos, así como trastornos debidos a enfermedades transitorias y a trastornos subclínicos que incrementan la susceptibilidad a otras enfermedades debido a inmunodepresión. Entre las pérdidas indirectas se incluyen los costos para el control de plantas tóxicas, la inhabilitación de potreros, la compra de otros animales para reposición y los gastos asociados al diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones los animales (Vallejo, 1980; Riet-Correa y col., 2001). En las intoxicaciones, los animales afectados (aunque no mueran) presentan pérdida de peso o disminución en la producción leche o huevos. En muchas de las plantas tóxicas existentes en Argentina tales como *Senna occidentalis*, *Ipomoea carnea*, *Senecio ssp*, *Solanum glaucophyllum*, *Echium plantagineum*, *Ammi biznaga*, *Ammi majus*, *Paspalum dilatatum*, *Cynodon dactylon*, *Conium maculatum*, *Claviceps purpurea*, *Baccharis coridifolia*, *Lantana camara*, *Leucaena leucocephala* se registran este tipo de pérdidas (Casper y col., 2008; Quiroz García y col., 2014; Marín, 2011).

S. occidentalis es una planta herbácea anual de la familia *Leguminosae*, subfamilia *Caesalpinoideae*, conocida vulgarmente en Argentina, principalmente en el Norte del país, como “cafetillo, falso café, pico de pájaro, café salvaje y hierba hedionda”; en Brasil como “fedegoso o manjerioba”; en Colombia como “cafecillo o café de Brusca”; en EEUU como “coffe senna” (Salas y Caspe, 2014; Oliveira-Filho y col., 2013). Se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y

subtropicales, su hábitat son áreas con pastos bajos en zonas con suelo fértil, campos cultivados y con sobrepastoreo (Barros y col., 1990). Son arbustos leguminosos erectos, ligeramente ramificados de 0,8 a 1,5 m de altura, de crecimiento principalmente anual, pero hay otras especies perennes. Las hojas son alternas, compuestas de cuatro o cinco pares de hojas ampliamente separadas a lo largo de un tallo común. Las flores son amarillas formando racimos en los extremos libres de los tallos principales. Los frutos de la planta tienen forma de vainas finas y planas de 7,5 a 10 cm, de consistencia blanda y color verde pálido cuando están verdes; gruesas y oscuras cuando maduran (Vashishtha y col., 2009; Yadav y col., 2010). Puede ser diferenciada de otras especies del género por el aspecto del fruto, el cual en *S. occidentalis*, crece con la extremidad libre hacia arriba (Tokarnia y col., 2012). Cada vaina contiene entre 50 y 60 pequeñas semillas (Vashishtha y col., 2009). Todas las partes de la planta son tóxicas, incluidas las hojas, tallos, vainas y semillas (Dollahite y Henson, 1965; Henson y Dollahite, 1966; Mercer, 1967), sin embargo, las semillas presentan mayor toxicidad (Dollahite 1964; Dollahite y Henson, 1965). Si bien no se ha determinado, algunos autores citan que el principio activo tóxico de *S. occidentalis* podría ser una diantrona, una antraquinona. Se cree que esta sustancia provoca alteraciones en el metabolismo mitocondrial por fallas en la fosforilación oxidativa, desencadenando edema y alteraciones en la estructura interna de esta organela (Calore y col., 1997; Górnjak, 2008; Barbosa-Ferreira, 2008). Estudios morfológicos y bioquímicos demostraron que el proceso miodegenerativo es secundario al déficit energético causado por la acción primaria del principio tóxico activo a nivel de las mitocondrias de las fibras musculares que da como resultado una disminución en la producción de ATP. Las lesiones subsecuentes se dan como consecuencia la lesión mitocondrial (Read y col., 1968; Simpson y col., 1971; Rogers, 1979; Barros y col., 1990; O'Hara; Pierce, 1974 a, b). Por este motivo, la muerte en los casos de intoxicación por *S. occidentalis* es atribuida a una insuficiencia cardíaca congestiva (O'Hara y col., 1969) seguida de insuficiencia respiratoria (Schmitz; Denton, 1977) resultantes del proceso miodegenerativo que afecta al miocardio, al diafragma y a los músculos intercostales. Esta hipótesis, que es bastante discutible, se basa en la observación frecuente de edema pulmonar, la congestión y necrosis centrolubulillar hepática en los animales intoxicados por *S. occidentalis* (O'Hara, Pierce, 1974 a,b; Read y col., 1968; Rogers y col., 1979). La planta también contiene otros componentes potencialmente nocivos, como una albúmina tóxica, algunos derivados antraquinónicos de fuerte acción catártica y un alcaloide volátil y termolábil (Nadal y col., 2003). También se han extraído de varias especies de *Senna*, inclusive *S. occidentalis*, sustancias como flavonoides, oxalato de calcio, glicósidos esteroides, glicósidos

antraquinónicos, senosideos A, B, C y D, emodina, aloe-emodina, reina e crisofanol e N-metilmorfina (Mariano-Souza, 2005; Tokarnia y col., 2012). Adicionalmente, se sabe que el contenido de estos principios tóxicos en *S. occidentalis* varía de acuerdo a las condiciones del suelo y el clima (temperatura y humedad) a los que la planta es sometida (González y col., 1994). Se ha demostrado que tallos, hojas y raíces de la planta procedentes de África contienen saponinas, esteroides, triterpenos, quininas, taninos y flavonoides. Por otro lado, gran cantidad de alcaloides fueron hallados en tallos, hojas y frutos de Etiopía (Smolenski y col., 1975). A pesar de toda esta información, otros autores reportaron que los principios miotóxicos no han sido aún determinados (Yadav y col., 2010; Tokarnia y col., 2012).

Por otro lado, el uso medicinal de las plantas del género *Senna* por humanos ocurre en varios países del mundo. En occidente, la planta ha sido utilizada como laxante por la acción catártica de los derivados antranoides contenidos en las plantas de este género (Siergers y col., 1993). En la India, esta leguminosa es conocida popularmente como Kasondi o Pamaad y es ampliamente utilizada en la medicina popular india en varias terapias (Chopra y col., 1980), como antídoto para intoxicaciones, como purificadora de la sangre, diurético, vermífugo, expectorante, analgésico y antiinflamatorio; así como también en el tratamiento de tuberculosis, gonorrea, anemia, gripe y enfermedades del tracto urinario (Aragão y col., 2009). También en la India, preparaciones compuestas por diversas hierbas son utilizadas para disturbios hepáticos y tienen como componentes las hojas de *S. occidentalis* que poseen un extracto etanólico supuestamente responsable de la acción hepatoprotectora de *S. occidentalis* (Jafri y col., 1999). En contrapartida, hay relatos de intoxicaciones por *S. occidentalis* en niños de zonas rurales de algunas regiones de India, por la ingestión de partes de la planta. Esos niños desarrollaron una enfermedad aguda y altamente mortal caracterizada por alteraciones nerviosas, lesiones degenerativas de hígado y de los músculos esqueléticos (Vashishtha y col., 2007a; Vashishtha y col., 2007b; Pawar y Kumar, 2007). En nuestro país, en años recientes se comunicó la ingestión de semillas de *S. occidentalis* por parte de una niña en la provincia de Tucumán, quien desarrollo insuficiencia hepática fulminante (Motto y col., 2014).

La planta es una leguminosa invasora de cultivos y durante la cosecha de los mismos puede haber contaminación por semillas que, posteriormente, serán ingeridas con la ración (Riet-Correa y col., 1998; Haraguchi y col., 2003). La intoxicación puede ocurrir por la ingestión de toda la planta, como sucede en bovinos; pero la forma más común de intoxicación se da de modo accidental, cuando las semillas de *S. occidentalis* no son separadas de los cereales (Oliveira-Filho y col., 2013). Por lo tanto,

es factible que esta afección también ocurra en producción de animales confinados, como en la avicultura y la porcicultura (Górniak, 2008). En el caso del maíz y de la soja es posible eliminar la contaminación por *S. occidentalis* por medio de procedimientos de limpieza por tamices comúnmente utilizados en las unidades de procesamiento. Para el sorgo, sin embargo, la limpieza, tanto por tamices como por ventilación, es ineficaz ya que sus granos tienen similares tamaño y densidad que las semillas de *S. occidentalis* (González y col., 1994; Haraguchi *et al.* y col., 2003; Hueza y col., 2007).

El curso en animales intoxicados varía desde una presentación aguda, subaguda a crónica, dependiendo de la cantidad del vegetal consumido (Tokarnia y col., 2012); por lo que la signología puede comenzar con una diarrea hasta presentar trastornos locomotores, y las alteraciones orgánicas se encuentran principalmente en músculos esqueléticos y cardíaco, hígado, riñón y corazón (Tokarnia y col., 2000; Albarracín y col., 2008; Vashishtha y col., 2009; Hubinger y col., 2000; Mussart y col., 2013). La gravedad de las lesiones difiere entre las especies animales (Barros, 1991).

Casos de intoxicación natural han sido registrados en bovinos, cerdos, equinos y en forma experimental la intoxicación ha sido reproducida en bovinos, equinos, porcinos, caprinos, conejos, roedores y aves (Colvin y col., 1986; Martins y col., 1986; Irigoyen y col., 1991; Rodrigues y col., 1993; Cavaliere y col., 1997; Calore y col., 1998; Nakage *et al.*, 2000; Tasaka y col., 2000; Barbosa-Ferreira y col., 2005; Aragao y col., 2009; Vashishtha y col., 2009; Marín, 2010; Barbosa-Ferreira y col., 2011; Carmo y col., 2011; Silva y col., 2011; Oliveira-Filho y col., 2013). Sin embargo, existen pocos antecedentes de la intoxicación experimental en cerdos con *S. occidentalis*, solo algunos trabajos que fueron realizadas en Brasil y EE.UU. con semillas molidas y mezcladas en la ración, en distintos porcentajes. Los signos comenzaron luego de una semana aproximadamente, observándose ataxia y otros signos de disfunción neuromuscular (Colvin y col., 1986; Martins y col., 1986; Rodrigues y col., 1993). En Argentina, la intoxicación espontánea fue descrita en bovinos en las provincias de Catamarca, Corrientes y Salta (Albarracín y col., 2008; Marín, 2010; Mussart y col., 2013); no habiendo sido reportados hasta la fecha episodios de intoxicación natural en cerdos.

En la mayoría de las especies, histológicamente se observó degeneración de fibras musculares esqueléticas y cardíacas; lesiones en hígado consistentes en degeneración vacuolar del parénquima; en riñón se evidenció necrosis tubular; por último el SNC mostró degeneración y espongirosis a nivel de cerebelo, edema e hipertofia de astrocitos en corteza cerebral (Oliveira-Filho y col., 2013; Vashishtha y col., 2009). En el porcino y el jabalí, se ha observado vacuolización hepática, principalmente a nivel periportal y mediozonal; necrosis segmental y procesos

regenerativos en musculo esquelético y a nivel renal, zonas de palidez y vacuolización de las células epiteliales de los túbulos (Martins y col., 1986; Rodriguez y col., 1993; Sant'Ana y col., 2011). En distintas especies de animales, pollos, bovinos y conejos, a través de microscopia electrónica de transmisión (Hebert y col., 1983; Flori y col., 1992; Barth y col., 1994; Tasaka y col., 2000), se observaron con mayor detalle las alteraciones en los distintos órganos, evidenciándose en las aves lesiones mitocondriales consistentes en pérdida de la matriz mitocondrial, fragmentación de crestas mitocondriales y pérdida de glucógeno con consecuente alteración de la función mitocondrial como mecanismo de toxicidad (Calore y col., 1997).

El diagnóstico de la intoxicación se basa en los signos clínicos, la epidemiología y en las características macroscópicas y microscópicas de las lesiones. Estos datos pueden ser complementados con determinaciones bioquímicas de enzimas séricas como creatinfosfoquinasa (CPK) y aspartatoaminotransferasa (AST). Además, para confirmar el diagnóstico, la planta debe ser puesta en evidencia, ya sea en las pasturas o contaminando las raciones. El diagnóstico diferencial debe hacerse con afecciones que causen degeneración y necrosis de músculos cardíacos y esqueléticos, como deficiencia de vitamina E y selenio (miopatía nutricional), intoxicación por ionóforos (salinomicina), y síndrome de estrés porcino (Rovira y col., 2016; Wendt y col., 2000). La deficiencia de vitamina E y selenio se la asocia con carencias absolutas o relativas de vitamina E y selenio debido a la práctica del uso de dietas de alta energía obtenidas con el agregado de ácidos grasos saturados. En la miopatía nutricional es difícil observar lesiones macroscópicas en los casos leves debido a la coloración blanquecina normal del músculo esquelético del cerdo (alto porcentaje de fibras tipo II). Los músculos tienen aspecto pálido y exhiben estriaciones blanquecinas particularmente en los músculos lumbares y de los miembros posteriores. Microscópicamente se observa degeneración, miólisis focal, necrosis y calcificación (Pierce; O'Hara, 1967; Schmitz; Denton, 1977; Van Vleet; Valentine, 2007). La mineralización no ha sido descrita en los casos de intoxicación con *S. occidentalis* (Barros, 1993; Barros y col., 1990; Van Vleet; Valentine, 2007). La intoxicación con ionóforos se presenta cuando hay error en la concentración, en el mezclado o cuando se administra conjuntamente con tiamulina (antibiótico macrólido muy usado en producción porcina) que interfiere en el metabolismo y excreción de los ionóforos, aún éstos dados en dosis correctas. En general no se observan lesiones macroscópicas. Se han reportado hematuria y mioglobinuria. Las lesiones microscópicas se caracterizan por necrosis con fragmentación de las fibras musculares, proliferación de miofibroblastos, células satélites y macrófagos. En músculo cardíaco se ha observado necrosis menos extensa que en los músculos

esqueléticos. El diagnóstico microscópico corresponde a necrosis muscular monofásica multifocal. También se ha descrito severa nefrosis tubular (degeneración hialina) debido a la excreción de mioglobina que es nefrotóxica (Rovira y col., 2016; Cappuccio y col., 2014; Plumlee y col., 1995). En los casos de la especie porcina intoxicada con *Senna* la mioglobinuria es un signo ausente, discreto o poco frecuente (Martins *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1993). Sin embargo, es frecuentemente documentada en rumiantes (Carmo *et al.*, 2011; Campos, 2014). El síndrome de estrés porcino es de naturaleza genética autosómica recesiva que se caracteriza por un defecto del receptor de rianodina (RYR-1) que regula el cierre de los canales de Ca en el retículo sarcoplásmico, favoreciendo la entrada intracelular de Ca con la consiguiente contracción y alteración del metabolismo celular. En la actualidad su incidencia se ha reducido debido a la utilización de líneas genéticas libres del gen. Este síndrome se caracteriza por muerte súbita durante el transporte, hipertermia, jadeo, taquipnea, sudoración, taquicardia, temblores, rigidez, paresia, cianosis o eritema cutáneo, en particular en los miembros pelvianos. Hay lesiones musculares y también se observa hemoglobinuria o mioglobinuria (Wendt *et al.*, 2000).

No existe tratamiento para la intoxicación con *S. occidentalis*, pero se recomienda el tratamiento sintomático con laxantes, astringentes, sedantes y antiespasmódicos para eliminar el tóxico y controlar el dolor (Schmitz; Denton, 1977). Es importante resaltar que tratamientos con vitamina E y selenio, además de no causar efecto beneficioso, pueden incluso, aumentar la gravedad del caso, por potenciar la toxicidad de *Senna occidentalis* (O'Hara *et al.*, 1970). Resulta una medida eficaz el retirar a los animales intoxicados, que no están en decúbito, del contacto con la planta o ración contaminada (Pierce; O'Hara 1967). Como medidas profilácticas es importante evitar la invasión de las pasturas por *S. occidentalis*. En los casos donde las pasturas estuvieran contaminadas, la recolección o corte mecánico debería ser sustituido por el manual.

METODOLOGÍA

1. Planta:

1.1 Recolección, identificación taxonómica y almacenamiento:

Para la experiencia se procedió a la recolección de las hojas, frutos y tallos de la planta *S. occidentalis* en distintos estadios vegetativos durante los meses de marzo a mayo del año 2017 en el Departamento Capital de la Provincia de Corrientes, Argentina (Figura 1). Las muestras fueron identificadas taxonómicamente en el Instituto de Botánica, perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, ubicado en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (IBONE-CONICET-UNNE) bajo el número de registro 540 (CTES). De estas plantas se seleccionaron sólo las vainas y semillas, las cuales se secaron a temperatura ambiente (Figura 2) y se almacenaron en recipientes cerrados hasta el momento del procesamiento del alimento.



Figura 1: *Senna occidentalis*. Corrientes, Argentina



Figura 2: Vainas de *Senna occidentalis*. Corrientes, Argentina.

1.2 Análisis fitoquímico:

1.2.1 Obtención de las muestras

Las vainas y semillas de *S. occidentalis* se separaron en tres grupos, semillas (S), vainas vacías (V) y vainas con semillas (V+S), luego fueron desecadas y molidas de tal manera que atravesaran un tamiz 20.

1.2.2 Obtención de los extractos

Se obtuvieron los extractos a partir de muestras molidas maceradas durante 24 h en solución acuosa con 25mM de bicarbonato de sodio y 250 mM de citrato de sodio (Yadav *et al.*, 2010). Posteriormente se filtró al vacío y se llevó a sequedad con un rotavapor Büchi a presión reducida (50°C).

1.2.3 Fitoquímica:

Se realizó la marcha fitoquímica de cada uno de los extractos para identificar: alcaloides (Dragendorff), fenoles (FeCl₃), esteroides (Liebermann Burchard, Salkowski), taninos (gelatina), aminoácidos (ninhidrina), antraquinonas (Bornträger), flavonoides (Shinoda), cardenolidos (Kedde) (Wagner y Bladt, 2001; Colegate y Molyneux, 2008).

1.2.3.1 Alcaloides: test de Dragendorf (ioduro de bismuto y potasio).

POSITIVO: en presencia de sales de alcaloides, en solución clorhídrica o sulfúrica, se observa un precipitado amorfo de color rojo ladrillo.

1.2.3.2 Fenoles: reacción con FeCl₃

POSITIVO: coloración verde a marrón para derivados del catecol, y coloración azulada para derivados del pirogalol.

1.2.3.3 Esteroides o triterpenos: Reacción de Liebermann-Burchard

POSITIVO: coloración verde o azul verdoso indica la presencia de núcleo esteroidal.

1.2.3.4 Taninos: reacción con gelatina/NaCl – placa o tubo-

POSITIVO: abundante precipitado indica la presencia de taninos.

1.2.3.5 Flavonoides: reacción de Shinoda

POSITIVO: naranja - flavonas, rojo cereza - flavonoles, violeta - flavanonas.

1.2.3.6 Aminoácidos:

ninhidrina al 0,1 % en solución alcohólica

POSITIVO: color violeta con los aminoácidos.

1.2.3.7 Antranoides: Quinonas – reacciones en tubo-

Solución de NaOH al 5 %

POSITIVO: soluciones amarillas en benceno, viran al rojo en medio alcalino y poseen fluorescencia roja a 365 nm. Sin tratamiento químico, todas las antraquinonas dan fluorescencia amarilla o rojo-marrón a 365nm.

1.2.3.8 Glucósidos cardiotónicos: Reactivo de Raymond- Marthoud

POSITIVO: coloración roja, naranja rojiza o violeta con cardenólidos.

2. Ensayos de toxicidad en animales:

Se emplearon seis (6) cerdos jóvenes (de 45 días de edad aproximadamente), provenientes de la Escuela Regional de Agricultura Ganadería e Industrias Afines (ERAGIA) dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE. Los animales fueron alojados en jaulas individuales de 2,75 m², instaladas bajo un módulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE que cuenta con techo de zinc, y paredes laterales ventiladas, en parte de mampostería y en otra de malla sima.

Previamente al inicio del experimento, todos los animales fueron sometidos a un examen clínico criterioso, pasando por un período de adaptación de 10 días, y recibieron alimento balanceado comercial, según el peso de cada uno. Así, cada cerdo recibió diariamente, en ración, el 3 % de su peso corporal. Todos los animales recibieron agua *ad-libitum* mediante el uso de bebederos de tipo chupete.

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales, conteniendo el mismo número de cerdos (3). Los animales del **grupo tratado** (GT) recibieron diariamente, durante 30 días, una ración conteniendo 10 % de vainas y semillas de *S. occidentalis* y los animales incluidos en el **grupo control** (GC) recibieron, durante igual periodo, sólo raciones comerciales desprovistas del material tóxico.

Semanalmente, los animales se pesaron y se obtuvo sangre de la vena cava craneal de cada uno de ellos para estudios bioquímicos. Al final del periodo experimental, se procedió al sacrificio de todos los cerdos. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE (Protocolo N°0068-2016), Argentina.

3. Preparación de la ración tóxica y análisis del alimento:

Para la elaboración del alimento con material tóxico, se emplearon vainas y semillas de *S. occidentalis* y alimento balanceado comercial para cerdos en crecimiento que fue igualmente molido (Figura 3). La molienda de las vainas y semillas se realizó con un Triturador Forrajero TRAPP TRF 400® (Figura 4). Ambos componentes se pesaron y, para preparar la mezcla de balanceado comercial y vainas y semillas molidas, se utilizó una mezcladora de albañil durante 15 minutos (Figura 5).

La producción de alimento con el material tóxico se realizó dos veces a la semana. Para descartar la posible contaminación de las raciones, se realizó la prueba ELISA con el fin de determinar micotoxinas, utilizando el kit de prueba total de aflatoxinas AgraQuant®.



Figura 3: Vainas y semillas de *S. occidentalis* molidas



Figura 4: Triturador Forrajero TRAPP TRF 400®



Figura 5: Mezclado del alimento

4. Evaluación clínica y del peso corporal:

Los animales diariamente fueron sometidos a una evaluación clínica con la finalidad de evidenciar algún signo clínico compatible con la intoxicación teniendo en cuenta alteraciones en la locomoción como claudicación, ataxia, incoordinación y cambios en la postura normal. Los animales se pesaron al inicio del experimento y, posteriormente, a intervalos semanales, siempre después de la evaluación clínica.

5. Evaluación del hemograma y perfil enzimático muscular:

La recolección de sangre de cada animal, se realizó por punción de la vena cava craneal con agujas y jeringas descartables. Se determinaron los diferentes parámetros sanguíneos por métodos de rutina: hematocrito, eritrocitos, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), leucocitos totales, proteínas totales, albúminas y globulinas, relación albúmina/globulina (RAG), urea, creatinina, ácido úrico.

También se evaluaron los niveles séricos de enzimas musculares tales como:

- ALP (fosfatasa alcalina): cinética c/p-nitrofenilfosfato (405 nm), reactivos Boehringer.
- CPK (creatinfosfokinasa): método UV optimizado con ATP-cisteína (334 nm), reactivos Wiener.
- AST (aspartatoaminotransferasa): técnica UV con NADH/L-aspartato (334 nm), reactivos Wiener.
- ALT (alaninaminotransferasa) método UV con NADH/oxoglutarato (340 nm), reactivos Wiener.
- CHE (butirilcolinesterasa): técnica cinética con butirilcolina (405 nm), reactivos Wiener.

6. Evaluación post mortem:

Los animales tanto de **GT** como de **GC** fueron sacrificados a los 30 días de iniciada la experiencia, momento en que presentaron signos clínicos compatibles con la intoxicación. A todos se les realizó la necropsia completa. Se tomaron muestras de diafragma; grupos musculares extensores, flexores, abductores y aductores de miembros pelvianos y torácicos que se fijaron en formol tamponado al 10 % para histopatología.

6.1. Evaluación histopatológica:

Las muestras obtenidas durante la necropsia se procesaron para su inclusión en parafina, obteniendo secciones de 5 μ m que se colorearon con hematoxilina y eosina. Adicionalmente las muestras de tejido muscular se tiñeron con Tricrómica de Gomori para su análisis histopatológico.

6.2 Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión:

Para esta técnica, las muestras de tejidos muscular que se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer fosfato 0,2M, pH 7,4 a una temperatura de 4°C durante 2 h. Luego de la fijación, las muestras se lavaron con solución buffer; para ello se realizaron 2 o 3 lavados en buffer fosfato cada 30 minutos. Posteriormente, se realizó una fijación en tetróxido de osmio al 1 % en buffer fosfato 0,2M pH 7,4. Luego los tejidos fueron deshidratados en etanol en concentraciones crecientes y, finalmente se incluyeron en resina epon. Se efectuaron cortes semifinos y ultrafinos que se observaron mediante un microscopio electrónico de transmisión (JOEL 1210 con GATAN doublé-tilt stage).

7. Análisis estadístico

Los valores se expresaron con sus medias y desviación estándar (DS). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el uso del análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student, con un nivel de significación de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se empleó el Programa Infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Planta:

1.1 Análisis fitoquímico

En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis fitoquímico de los principios activos presentes en los extractos obtenidos de *S. occidentalis* (V, V+S, S), las pruebas empleadas para la determinación de los compuestos y los patrones de referencia.

El extracto acuoso de V+S de *S. occidentalis*, resultó estar compuesto por metabolitos secundarios como fenoles y aminoácidos. Particularmente, en el extracto de S se evidenciaron alcaloides, antraquinonas, esteroides, flavonoides y cardenólidos. Sin embargo, en el extracto de V, no se identificaron ninguno de los compuestos evaluados.

Estos compuestos activos son bien conocidos y reportados en la literatura (Yavad y col., 2010; Panigrahi y col., 2015).

Autores han observado, a partir de un extracto metanólico de hojas de *S. occidentalis*, compuestos activos similares, sin embargo las antraquinonas no han sido detectadas en dicho extracto (Yahaya y col., 2019). En contraste con lo antes mencionado, el extracto metanólico de semillas de *S. occidentalis* revela la presencia de cinco antraquinonas, las cuales han sido identificadas como physcion, Emodin, Rhein, Aloe-Emodin y Chrysophanol (Panigrahi y col., 2015).

Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de las quinonas. En las plantas, las antraquinonas se encuentran principalmente en el corazón de la madera, en la corteza y en la raíz y solo ocasionalmente, en el tallo, semilla y frutos (Quirós Cognuck, S. 2007). En el presente estudio mediante el análisis fitoquímico se detectaron, únicamente en el extracto de semillas de *S. occidentalis*. Sobre la base de estos hallazgos y de la bibliografía de referencia (Yavad y col., 2010) se consideró que las antraquinonas podrían ser las responsables del efecto tóxico observado en nuestra experiencia.

Tabla 1: Análisis fitoquímico de distintas partes de *S. occidentalis*

	Vainas	Vainas + Semillas	Semillas	Patrones utilizados
Dragendorff (alcaloides)	-	-	+	Quinina (ppdo rojo ladrillo)
FeCl₃ (fenoles)	-	+	++	Floroglucina Ppdo. verde-marrón
Liebermann Burchard (esteroides)	-	-	+ Verde	Colesterol Verde
Salkowski (esteroides)	-	-	+	Colesterol Rojo
Gelatina (taninos)	-	-	-	Te negro Ppdo blanco.
(ninhydrina) Aminoácidos	-	+	++	alanina violeta
Bornträger (antraquinonas)	-	-	+	1,4-naftoquinona Rojo visible fluorescencia roja a 365 nm
Shinoda (flavonoides)	-	-	-	Naringina Rojo bordó
Kedde (cardenólidos)	-	-	+ Violeta (Rf 0,62)	Extracto alcohólico de <i>Asclepias curassavica</i> violeta (Rf. 0,86)

3. Análisis del alimento:

No se detectaron micotoxinas (aflatoxina A y B) en las muestras de ración, que se evaluaron utilizando ELISA.

4. Evaluación clínica y del peso corporal:

El **GT**, conformado por cerdos que consumieron 10 % de vainas y semillas de *S. occidentalis*, presentó diarrea como signo clínico inicial a los 22 días, mientras que la anorexia fue el último signo clínico observado a los 29 días. Adicionalmente, los animales intoxicados, mostraron lordosis, letargia, ataxia y temblores musculares, principalmente a nivel de las extremidades posteriores. Además, se mostraron reacios

a moverse y presentaron decúbito esternal o lateral (Figura 6). Finalmente, cuando los animales fueron forzados a mantenerse de pie, permanecieron con sus extremidades posteriores apoyadas una sobre otra (Figura 7). Dichas alteraciones locomotoras se observaron a partir de los 25 días de la experiencia y fueron haciéndose más evidentes hacia el final de la misma. El **GC** no mostró alteraciones locomotoras, ni otros signos clínicos. Varios autores han reportado signos similares en diferentes especies animales intoxicadas con *Senna occidentalis* (Graziano y col., 1983; Barros y col., 1999; Mussart y col., 2013; Sant'Ana y col., 2011). La signología observada en nuestros animales varió en progresión y severidad con respecto a otras intoxicaciones naturales y experimentales con *S. occidentalis*, seguramente relacionada con la concentración de la planta consumida en la ración.



Figura 6: Cerdo afectado por el consumo de *Senna occidentalis*.
Presenta dificultad para incorporarse.



Figura 7: Cerdo afectado por el consumo de *Senna occidentalis*.
Estación forzada con las extremidades posteriores apoyadas una sobre otra.

En cuanto a la evaluación del peso corporal, los animales del **GT** mostraron una disminución en la ganancia de peso corporal durante las primeras 3 semanas. En la última semana presentaron pérdida de peso en comparación con los animales de, finalizando la experiencia a los 30 días con un peso corporal de $24,08 \pm 0,38$ Kg (tabla 2). Estos resultados coinciden con distintos autores, quienes han reportado pérdida de peso en animales intoxicados con *S occidentalis*, y han afirmado que diferentes concentraciones de semillas en la ración diaria afecta negativamente la ganancia de peso corporal de diferentes especies animales (Rodrigues y col., 1993; Vashishtha y col., 2009).

Tabla 2: Comparación de los pesos de los animales experimentales (Kg).

	Grupo 1 Intoxicado <i>S. occidentalis</i>	Grupo 2 Control
Inicial	22 ± 0,79	23,10 ± 0,26
Semana 1	23,43 ± 0,31	26,20 ± 0,30
Semana 2	26,27 ± 1,25	29,43 ± 0,21
Semana 3	26,35 ± 0,40	32,20 ± 0,36
Final	24,08 ± 0,38	35,7 ± 1,82

5. Evaluación del hemograma y perfil enzimático:

Los valores hematológicos (hematocrito, concentración de hemoglobina y RBC) se mantuvieron dentro del rango de normalidad en ambos grupos. El hemograma no reveló alteraciones significantes.

Como se muestra en la Tabla 3 la intoxicación por *S. occidentalis* en cerdos causó elevación significativa de la actividad de la enzima CPK, en comparación con el grupo de animales controles ($p < 0.05$). Este hallazgo no ha sido previamente reportado en la especie porcina intoxicada con *S. occidentalis* (Colvin y col., 1986; Rodrigues y col., 1993); si bien, otros investigadores han descripto incremento en las actividades séricas de AST y CPK en otras especies animales intoxicadas con la misma planta (Oliveira-Filho y col., 2013; Sant`Ana y col., 2011; Marin 2010). Es sabido que la enzima CPK es uno de los indicadores séricos que mayor ayuda diagnóstica nos brinda para evaluar la integridad muscular (Da Cruz, 2011). La detección precoz de la actividad incrementada de la enzima, puede resultar de valor diagnóstico en la intoxicación accidental por *S. occidentalis*.

Tabla 2: Valores de la enzima CPK en suero de cerdos intoxicados con 10 % de frutos de *S. occidentalis* en la ración diaria.

Tratamientos (n=3/grupo)	Semanas							
	1		2		3		4	
	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
CPK (UI/L)	37,5±3,54	43±8,49	282±53,74	838,65±181,66*	419±43,84	2032±124,45*	507±79,20	12625±3385*

*Valores ± DS (desvío estándar) son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) comparado con los animales controles. CPK: Creatinfosfokinasa.

6. Evaluación post mortem:

A la necropsia, en los animales de **GT** los hallazgos macroscópicos consistieron en áreas levemente blanquecinas en músculos esqueléticos (diafragma, grupos musculares extensores, flexores, abductores y aductores de miembros pelvianos y torácicos). La orina no presentó cambios de color en los animales intoxicados, lo que concuerda con varios autores, quienes aseguran que la mioglobinuria es un signo ausente, discreto o poco frecuente en la especie porcina intoxicada con *S occidentalis* (Martins y col., 1986; Rodrigues y col., 1993), aunque es frecuentemente documentada en rumiantes (Carmo y col., 2011; Campos, 2014). No se observaron lesiones macroscópicas en los animales de **GC**.

6.1. Evaluación histopatológica

Las lesiones histológicas de los animales de **GT** estuvieron restringidas a los músculos esqueléticos. Todas las fibras musculares evidenciaron necrosis coagulativa segmentaria multifocal, con escasos procesos regenerativos y fibrosis multifocal. Los segmentos necróticos de las fibras musculares se presentaron tumefactos, eosinofílicos, fragmentados y con cariólisis (Figura 8A). Algunos segmentos necróticos resultaron infiltrados por macrófagos (Figura 8B) y otros segmentos fueron reemplazados por miofibras de menor diámetro, con citoplasma basofílico y núcleos centrales dispuestos en hilera (mioblastos) (Figura 8C), a diferencia de los núcleos periféricos observados en los animales de **GC** (Figura 8D). En general, la necrosis muscular ha sido descripta como monofásica o polifásica. En la necrosis segmentaria monofásica multifocal se observan múltiples focos de lesión de igual evolución,

indicativos de un único evento dañoso. En cambio las lesiones polifásicas, caracterizadas por múltiples focos de lesión con diferentes grados de evolución, resultan de un daño repetido durante un periodo prolongado (Cooper y Valentine, 2016). A pesar de que las lesiones en la intoxicación por *S. occidentalis* son descritas típicamente como necrosis monofásica multifocal (Cooper y Valentine, 2016), en esta experiencia los cambios histológicos hallados, y también descritos por otros autores en distintas especies animales intoxicadas con *Senna*, consistieron en lesiones degenerativas y necróticas, conjuntamente con procesos regenerativos en la musculatura esquelética, resultando entonces en una miopatía polifásica multifocal (Carmo y col., 2011; Herbert y col., 1983; Irigoyen y col., 1991; Martins y col., 1986; Colvin y col., 1986; Rodrigues y col., 1993).. Una lesión monofásica multifocal podría ser consecuencia de la ingestión de una toxina en una única ocasión; sin embargo, en los casos en que la exposición a la toxina fuese repetida y prolongada desarrollarán nuevas lesiones (necrosis segmentaria) al mismo tiempo en que la regeneración estaría teniendo lugar. Esto dará como resultado una lesión polifásica multifocal, como en el caso del presente estudio.

Adicionalmente a las lesiones degenerativas descritas más arriba, en nuestros animales se observó abundante fibrosis, reemplazando al tejido muscular, evidenciada mediante la tinción especial Tricrómica de Gomori (Figura 9A). Lesiones severas como las aquí descritas no han sido reportadas previamente en cerdos aunque sí fueron demostradas en tejido cardíaco de bovinos intoxicados naturalmente con la planta (Carmo y col., 2011). Los animales controles no presentaron lesión muscular (Figura 9B).

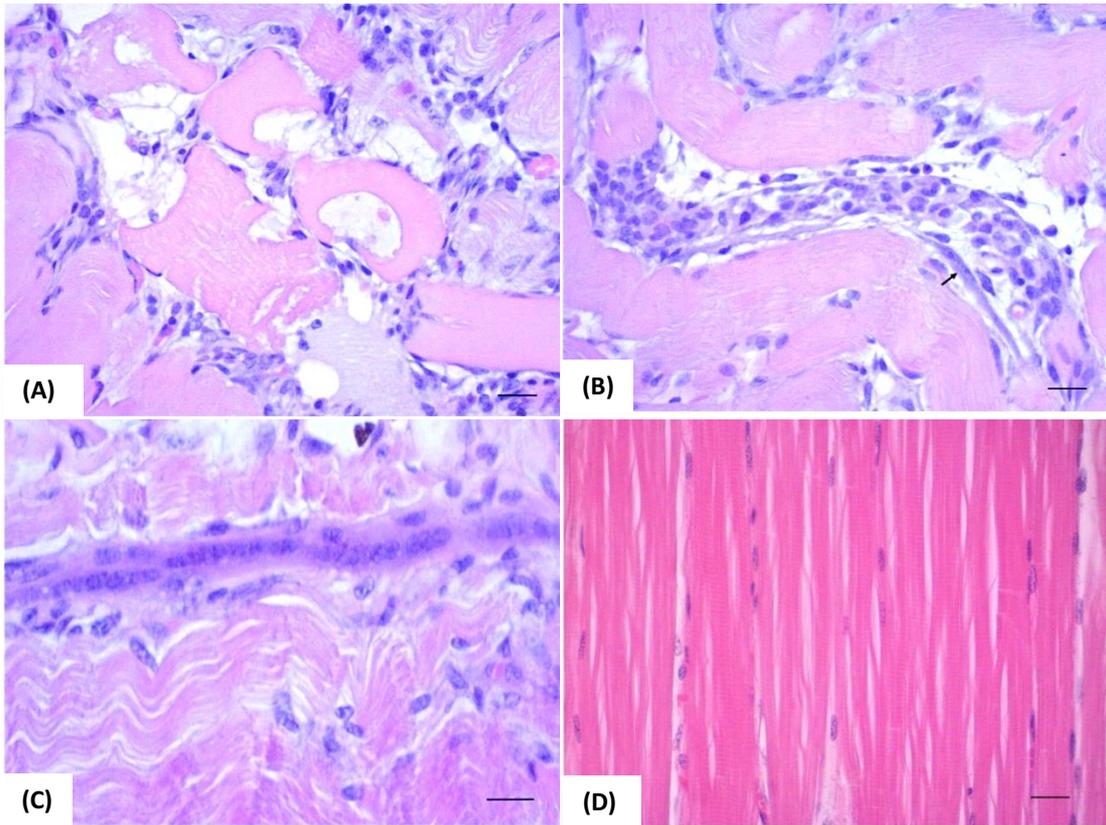


Figura 8. Microscopia óptica. Secciones histológicas del músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con 10 % de *Senna occidentalis* en la ración diaria (A-C) y de un cerdo control (D), teñidos con Hematoxilina-Eosina. A) Se observan segmentos de fibras musculares fragmentados, tumefactos 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 (D) Fibras musculares esqueléticas sin lesiones (barra = 20 μ m)

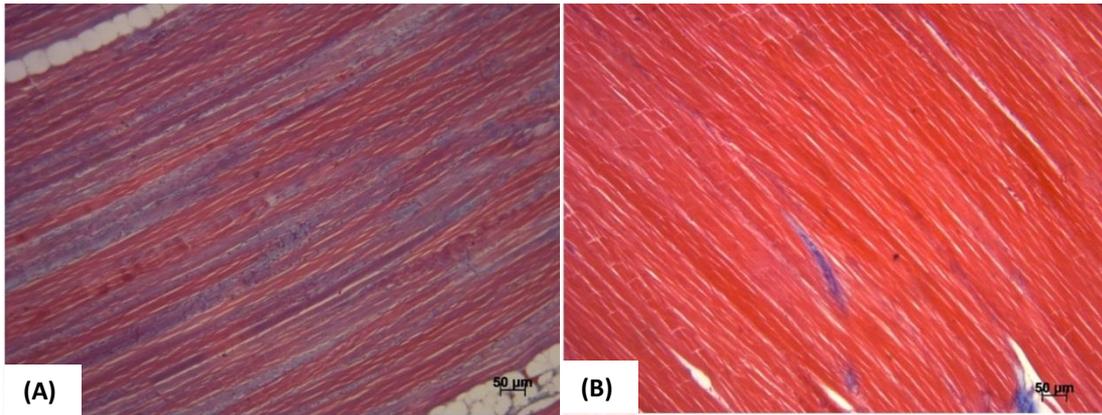


Figura 9. Microscopia óptica. Secciones histológicas de músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con 10 % de *Senna occidentalis* en la ración diaria (A) y de un cerdo control (B), teñidas con Tricrómico de Gomori. A) Se evidencia fibrosis intersticial en los animales intoxicados. B) Tejido muscular sin lesiones. (barra = 50 µm)

6.2. Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Mediante microscopía electrónica de transmisión se pudo observar, en el **grupo 1**, a nivel del músculo esquelético, diferentes grados de degeneración mitocondrial. Algunas mitocondrias se encontraban dilatadas con pérdidas de algunas crestas y otras se hallaban vacías, con crestas totalmente ausentes. Adicionalmente, a nivel del músculo diafragmático se observó pérdida de segmentos de miofibrillas, visualizándose a fragmentación de los miofilamentos y aumento de detritos a nivel del sarcoplasma (Figura 10). El daño ultraestructural mitocondrial no ha sido reportado previamente en esta especie animal. En rumiantes, trabajos previos utilizando MET, han descrito alteraciones mitocondriales, principalmente en células del músculo esquelético y hepáticas (Barbosa-Ferreira y col., 2005). Según Cheville 2009, el daño mitocondrial es la lesión estructural primaria en los animales intoxicados con *S. occidentalis*, por lo que consecuentemente se produce degeneración miofibrilar, necrosis de miocitos y falla cardíaca congestiva. En el presente trabajo no se observaron cambios histológicos en el músculo cardíaco. Sin embargo, y en concordancia con otros autores, observamos marcada miodegeneración en los músculos esqueléticos. En particular, las lesiones halladas en músculo diafragmático, podrían causar un trastorno respiratorio y con ello la muerte del animal (Barth y col., 1994). Algunos autores han reportado que la mitocondria es la organela blanco de los principios activos tóxicos de *S. occidentalis* (Hueza y col., 2007).

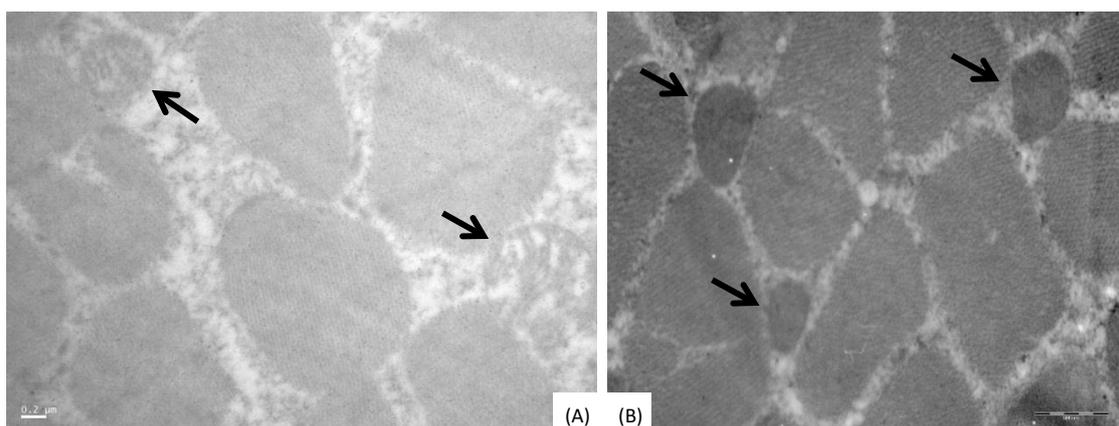


Figura 10: Microscopía Electrónica de Transmisión de músculo semimembranoso correspondiente a un cerdo intoxicado con *Senna occidentalis* (A) y a un cerdo control (B). A) Se observan las miofibrillas con separación y se identifican dos mitocondrias (flechas), con marcada tumefacción, vacuolización y pérdida completa de las crestas (cristolisis). (barra = 0,2 μm) B) Tejido muscular con estructura normal, mitocondrias (flechas) sin alteraciones. (barra = 500 nm).

CONCLUSIONES

Los resultados fitoquímicos confirman la presencia de principios activos potencialmente tóxicos en las semillas de *S. occidentalis*. Los compuestos identificados pertenecen a la familia de las antraquinonas.

Además, el presente trabajo confirma la acción miotóxica con consecuente degeneración muscular y áreas de fibrosis indicativas de proceso de reparación muscular, en cerdos intoxicados con una ración comercial mezclada con 10 % de semillas y vainas de *S. occidentalis*. El estudio ultraestructural de las fibras musculares esqueléticas permitió identificar daño mitocondrial. El perfil enzimático reveló un significativo incremento en la actividad sérica de la CPK. Ambas alteraciones no han sido descritas previamente en cerdos. *S. occidentalis* tiene amplia distribución en nuestra región y es una especie invasora de cultivos. Dado que la mayoría de los casos de intoxicación descritos se han presentado como consecuencia de la contaminación accidental, de raciones realizadas con cereales, con frutos o semillas de la planta, es importante incluir la posibilidad de intoxicación con *S. occidentalis* entre los diagnósticos diferenciales en cerdos con alteraciones locomotoras, junto con la posibilidad de deficiencia de vitamina E y selenio (miopatía nutricional), intoxicación por ionóforos (salinomicina) y síndrome de estrés porcino.

Futuros estudios son necesarios para evaluar el grado de regeneración del músculo dañado en los cerdos, una vez retirado el alimento contaminado con *S. occidentalis* y la posibilidad de su posterior utilización para consumo como carne fresca o chacinado.

BIBLIOGRAFIA

1. Albarracín, D.O.; Costa, E.F.; Quiroga, M.A.; Idiart, J.R. 2008. Mortandad de bovinos asociada a la ingestión de *Cassia occidentalis* (*Senna occidentalis*). Descripción de un caso. Rev.Med Vet 89, 126.
2. Anuario 2012. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. www.minagri.gob.ar
3. Aragao, T.P.; Lyra, M.M.; Silva, Andrade, B.A.; Ferreira, P.A.; Ortega, L.F.; Silva, S.D.; Silva, J.C.; Fraga, M.C.; Wanderley, A.G.; Lafayette, S.S. 2009. Toxicological reproductive study of *Cassia occidentalis* L. in female Wistar rats. J Ethnopharmacol 123, 163-166.
4. Barbosa-Ferreira, M.; Dagli, M.L.; Maiorka, P.C.; Górnaiak, S.L. 2005. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. Food Chem Toxicol 43, 497-503.
5. Barbosa-Ferreira, M. 2008. Proposta de modelo para o estudo de toxicologia perinatal em ruminantes: avaliação dos efeitos tóxicos da *Senna occidentalis* em caprinos. 186p. Tesis (Doctorado en Patología experimental y Comparada) - Facultad de Medicina Veterinaria e Zootecnia. Universidad de São Paulo, São Paulo, 2008.
6. Barbosa-Ferreira, M.; Pfister, J.A.; Gotardo, A.T.; Maiorka, P.C.; Górnaiak, S.L. 2011. Intoxication by *Senna occidentalis* seeds in pregnant goats: prenatal and postnatal evaluation. Exp Toxicol Pathol 63: 263-268.
7. Barros, C. S. L. 1993. Intoxicação por plantas que afetam o sistema muscular. Intoxicação por *Senna occidentalis*. In: Riet-Correa, F.; Méndez, M. C.; Schild, A. L. Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Montevideu: Hemisferio Sur. p.201-213.
8. Barros, C.S.L.; Pilati, C.; Andujar, M.B.; Graca, D.L.; Irigoyen, L.F.; Lopes, S.T. and Santos, C.F. 1990. Intoxicacao por *Cassia occidentalis* em bovinos. Pesq Vet Bras, 10, 47-58.
9. Barros, C.S.L. 1991. Intoxicacoes por plantas que afetam o sistema muscular. Intoxicacao por *Senna occidentalis*. In: Intoxicacoes por plantas e micotoxicoses em animais domésticos, (Editorial Hemisferio Sul do Brasil), 201 – 213.
10. Barros, C.S.L.; liha, M.R.S.; Bezerra Junior, R.S.; Langohr, I.M; Kommers, G.D. 1999. Intoxicacao por *Senna occidentalis* em bovinos em pastoreio. Pesq. Vet. Bras. 19, 68-70.

11. Barth, A. T., Kommers, G. D., Salles, M. S., Wouters, F. 1994. Coffee Senna (*Senna occidentalis*) poisoning in cattle in Brazil. *Vet. Hum. Toxicol.*, 36, 541-545.
12. Brunori, J.C. 2007. Sistemas de producción a campo; cambios cualitativos para afrontar las transformaciones de la cadena de valor porcina. *Fericerdo 2007*, E.E.A INTA Marcos Juárez. Informe de Actualización Técnica N° 6:23-26.
13. Brunori, J.C. 2013. Producción de cerdos en Argentina. Situación. Oportunidades. Desafíos. Curso Internacional de Agricultura de Precisión. Manfredi, Córdoba, Argentina.
14. Burkart, A. 1987. *Leguminosae*, en Troncoso de Burkart, N. y N. M. Bacigalupo (Eds.). *Flora Ilustrada de Entre Ríos*. Col. Cient. INTA 4, 442-738.
15. Calore, E.E.; Cavalieri, M.J.; Haraguchi, M.; Górnjak, S.L.; Dagli, M.L.; Raspantini, P.C.; Calore, N.M.; Weg, R. 1997. Experimental mitochondrial myopathy induced by chronic intoxication by *Senna occidentalis* seed. *J. Neurol. Sci.*, 146, 1 – 6.
16. Calore, E.E.; Cavalieri, M.J.; Haraguchi, M.; Górnjak, S.L.; Dagli, M.L.; Raspantini, P.C.; Calore, N.M.; Weg, R. 1998. Toxic peripheral neuropathy of chicks fed *Senna occidentalis* seeds. *Exotoxicol Environ Saf* 39, 27-30.
17. Campos, É. M. 2014. Intoxicação experimental por *Senna occidentalis* e *Senna obtusifolia* em ovinos. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 8-31.
18. Carmo, P.M.S.; Irigoyen, L.F.; Lucena, R.B.; Figuera, R.A.; Kommers, G.D.; Barros, C.S.L. 2011. Spontaneous coffee senna poisoning in cattle: report on 16 outbreaks. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 139-146.
19. Cappuccio, J.; Lozada, M.I.; Quiroga, M.A.; Dibarbora, M.; Pintos, M.E.; Perez, E.; Barrales, H.; Machuca, M.; Arauz, S.; Perfumo, C.J. 2014. Acute salinomycin toxicosis in a swine herd. *Proceedings of the 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico – June 8-11*-pp 328 Practitioner Line.
20. Caspe, S. G., Bendersky, D., Barbera, P. 2008. Plantas tóxicas de la provincia de Corrientes. *Serie Técnica*, (43).
21. Cavalieri, M.J.; Calore, E.E.; Haraguchi, M.; Górnjak, S.L.; Dagli, M.L.; Raspantini, P.C.; Calore, N.M.; Weg, R. 1997. Mitochondrial myopathy in *Senna occidentalis*-seed-fed chicken. *Ecotoxicol Environ Saf* 37,181-185.
22. Cheville, N. F. 2009. Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease. In: Meehan J. T. (ed). *Myotoxins*. 2nd. John Wiley & Sons. Iowa State, USA. pp: 635-651.

23. Chopra, R. N.; Nayar, S. L.; Chopra, I. C. 1980. Glossary of Indian Medicinal Plants, New Delhi; Council for Scientific Ind.
24. Colvin, B.M., Harrison, L.R, Sangster L.T., Gosser, H.S. 1986. *Cassia occidentalis* toxicosis in growing pigs. J Am Vet Med Assoc 189 (4), 423-426.
25. Cooper B.J. & Valentine B.A. 2016. Muscle and tendon. En: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Ed.: M. Grant Maxie. Sixth Edition. Elsevier, St. Louis, Missouri. pp: 164-249.
26. Da Cruz J.K. 2011. Indicadores bioquímicos da função muscular. Seminário em marco del Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
27. Dollahite, J.W. 1964. Coffe senna (*Cassia occidentalis*) poisoning in animals. Texas Agriculture Experimental Station. Progress Report 2318, College Station: Texas A & M University.
28. Dollahite, J.W.; Henson, I.B. 1965. Toxic plants as the etiologic agent of myopathies in animals. Am J Vet Res 2, 749-752.
29. Flory, W.; Spainhour, B.C.; Colvin, B.; Herbert, C.D. 1992. The toxicologic investigation of a feed grain contaminated with seeds of the plant species *Cassia*. J Vet Diag Invest 4, 65-69.
30. Gonzáles, E., Butolo, J.E., Silva, R.D. M. Lamas da Silva, J. M. 1994. Toxicidade de sementes de fedegoso (*Cassia occidentalis* L.) para frangos de corte. Scientia Agricola, São Paulo v-51,169-174.
31. Górnaiak, S.L. 2008. Plantas tóxicas de interesse agropecuário. In.; Spinosa H.S., Górnaiak, S.L, Paterno-Neto J. Toxicologia aplicada à Medicina veterinária. 1ªed, Barueri :Manole, cap 15, pp.415-458.
32. Graziano, M. J., Flory, W., Seger, C. L., Hebert, C. D. 1983. Effects of a *Cassia occidentalis* extract in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). Ame JVet Res, 44, 1238-1244.
33. Haraguchi, M.: Dagli, M.L.; Raspantini, P.C.; Górnaiak, S.L. 2003. The effects of low doses of *Senna occidentalis* seeds on broiler chickens. Vet Res Commun. 27, 321-328.
34. Hebert, C. D., Flory, W., Seger, C., Blanchard, R. E. 1983. Preliminary isolation of a myodegenerative toxic principle from *Cassia occidentalis*. Am J Vet Res, 44, 1370-1374.
35. Henson I. B. & Dollahite I. W. 1966. Toxic myodegeneration in calves produced by experimental *Cassia occidentalis* intoxication. Am J Vet Res 27, 947-949.
36. Hubinger, C.; Döbereiner, J.; Vargas, P. 2000. Plantas tóxicas do Brasil, Helianthus Ed., Rio de Janeiro. pp: 145-150.

37. Hueza, I.M.; Latorre, A.O.; Raspantini, P.C.F; Raspantini, L.E.R; Mariano-Souza, D.P.; Guerra, J.L.; Górnaiak, S.L. 2007. Effect of *Senna occidentalis* seeds on immunity in broiler chickens. J Vet Med Series A, 54,179-185.
38. Irigoyen, L.F.; Graca, D.L.; Barros, C.S.L. 1991. Experimental poisoning by *Cassia occidentalis* (*Leg. Caes.*) in horses. Pesq Vet Bras 11, 35-44.
39. Jafri, M. A., Subhani, M. J., Javed, K., Singh, S. 1999. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. J Ethnopharmac, 66, 355-361.
40. Mariano-Souza, D.P. 2005. Avaliação dos efeitos tóxicos da *Senna occidentalis* em ratos. Parâmetros: bioquímicos, hematológicos, anatomopatológicos e inflamatórios (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
41. Marín, R.E. 2010. Miopatía tóxica en bovinos asociada al consumo de *Cassia occidentalis* en el norte de Salta. Vet Arg 27, 1-14.
42. Marín, R. M. 2011. Aportes al conocimiento de las plantas toxicas para el ganado en la provincia de Jujuy. Vet Arg, 30(302), 18-19.
43. Martins, E.; Martins, V.M.V.; Riet-Correa, F.; Soncini, R.A.; Paraboni, S.V. 1986. Intoxicao por *Cassia occidentalis* (*Leguminoseae*) em suinos. Pes Vet Bras 6, 35-38.
44. Mercer, H.D. 1967. *Cassia occidentalis* toxicosis in cattle. J Am Vet MedAssoc 151,735-741.
45. Moreno, S., Denogean, F., Martín, M., Ibarra, F., Baldenegro, A. 2009. Effects of toxic plants on cattle production in Sonora-Mexico. Revista mexicana de agronegocios. 14 (26),179-191.
46. Mussart, N.B., Koza, G.A., Lértora, J., Álvarez Chamale, G.M., Coppo, J.A. 2013. Intoxicación por “cafetillo” (*Cassia occidentalis*) en bovinos del nordeste argentino. Rev. Vet. 24:2, 138-143.
47. Nadal, S. R.; Calore, E.E; Manzione, C.R.; Puga, F.R.;Perez N.M. 2003. Effects of long-term administration of *Senna occidentalis* seeds in the large bowel of rats. Pathol Res Prac 199:,733-737.
48. Nakage, A.P.; Macari, M.; Nakaghi, L.S.; Malheiros, E.B.; Vasques, L.H.; Secato, E.R. 2000. Estudos hematológico e hormonal de fragos de corte tratados com contaminates do milho: *Crotalaria spectabilis* e *Senna occidentalis*. Braz. J Vet Res Anim Sci 37,5.
49. O'Hara, P. J. & Pierce, K. R. 1974a. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. I. Morphologic studies in poisoned rabbits. Vet Pathol 11,97-109.

50. O'Hara, P. J. & Pierce, K. R. 1974b. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. II. Biochemical studies in poisoned rabbits. *Vet Pathol* 11;110-124.
51. O'Hara, P. J.; Pierce, K. R.; Kay Read, W. 1969. Degenerative Myopathy Associated with Ingestion of *Cassia occidentalis* L.: Clinical and Pathologic Features of the Experimentally Induced Disease. *Am J Vet Res* 30, 2173-2180.
52. O'Hara, P. J., Pierce, K. R., Read, W. K. 1970. Effects of vitamin E and selenium on *Cassia occidentalis* intoxication in cattle. *AmJ Vet Res* 31, 2151-2156.
53. Oliveira-Filho, J.P., Cagnini, D.Q., Badial, P.R., Pessoa, M.A., Del Piero, F., Borges, A.S. 2013. Hepatoencephalopathy síndrome due to *Cassia occidentalis* (*Leguminosae, Caesalpinioideae*) seed ingestión in horses. *Equine Vet J* 2013 Mar; 45, 240-4.
54. Oudhia, P. 2008. Major Cassia species of Chhattisgarh, India: Natural occurrence, traditional medicinal knowledge and Trade. Disponible en: http://www.botanical.com/site/columnpoudhia/108_cassia.html.
55. Panigrahi, G.K., Ch, R., Mudiam, M.K., Vashishtha, V.M., Raisuddin, S., Das, M., 2015. Activity-guided chemo toxic profiling of *Cassia occidentalis* (CO) seeds: Detection of toxic compounds in body fluids of CO-exposed patients and experimental rats. *Chem. Res. Toxicol.* 28 (6), 1120-1132. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00056>
56. Papotto, D., 2006. Producción porcina en Argentina pasado, presente y futuro. V memoria del congreso de producción porcina del MERCOSUR. Pág 120.
57. Pierce, K. R. & O'Hara, P. J. 1967. Toxic myopathy in Texas cattle. *Southwest Vet* 20, 17.
58. Plumlee, K.H.; Johnson, B.; Galey, F.D. 1995. Acute salinomycin toxicosis of pigs. *J Vet Diagn Invest* 7,419-420.
59. Quirós Cognuck, S. 2007. Estudio del efecto de la pulpa del fruto de *Cassia grandis* (Carao) sobre el músculo liso de diferentes tejidos in vivo y ex vivo. Tesis de Magister Scientiae en Bioquímica. Universidad de Costa Rica.
60. Quiroz García, J. L., Laplace, L. V., Rodríguez, A. M., Laplace, S. A. 2014. Plantas tóxicas para el Ganado en la Cuenca del Salado.
61. Read, W. K., Pierce, K. R., O'Hara, P. J. 1968. Ultrastructural lesions of an acute toxic cardiomyopathy of cattle. *Lab Invest* 18, 227-231.
62. Riet-Correa, F. & Medeiros, R. M. T. 2001. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq Vet* 21,38-42.

63. Riet-Correa, F.; Soares, M.P.; Mendez, M. C. 1998. Intoxicações em equinos no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria .28,715-722.
64. Rodrigues, U.; Riet-Correa, F.; Mores, N. 1993. Intoxicacao experimental em suínos com baixas concentracoes de *Senna occidentalis* (Leg. Caes.) na racao. *Pes Vet Bras* 13, 57-66.
65. Rogers, R. J. 1979. The toxicity of *Cassia occidentalis* for cattle. *Aus Vet J* 55, 408-412.
66. Rovira, A. & Sturos, M. 2016. Diagnosis of ionophore intoxications in pigs. *National Hog Farmer* Aug 29, 2016. Recuperado de: <http://www.nationalhogfarmer.com/nutrition/diagnosis-ionophore-intoxications-pigs>
67. Salas, J.M. & Cape, G. 2014. Intoxicación de bovinos con cafetillo en el nordeste argentino. *Serie técnica N° 506*, INTA Ed., ISSN 0327/3059.
68. Sant'Ana F.J.F., Garcia E. C., Rabelo R. E., Ferreira Júnior C. da S., Freitas Neto A. P., Verdejo A.C.F. 2011. Intoxicação espontânea por *Senna occidentalis* em javalis (*Sus scrofa ferus*) no Estado de Goiás. *Pesq Vet Bras* 31:702-706.
69. Schimitz, D. O. & Denton J. H. 1977. Senna bean toxicity in cattle. *Southwestern Vet* 30, 165-170.
70. Siegers, C. P., von Hertzberg-Lottin, E., Otte, M., Schneider, B. 1993. Anthranoid laxative abuse--a risk for colorectal cancer. *Gut*, 34, 1099-1101.
71. SIGSA- Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales – Dirección de Sanidad Animal – SENASA. 2017. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php>.
72. Simpson, C. F., Damron, B. L., Harms, R. H. 1971. Toxic myopathy of chicks fed *Cassia occidentalis* seeds. *Avian Dis*, 15, 284-290.
73. Silva, M.G., Aragao, T.P., Vasconcelos C.F., Ferreira P.A., Andrade B.A., Costa I.M., Costa-Silva J.H., Wanderley A.G., Lafayette S.S. 2011. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* stem and leaf in Wistar rats. *J Ethnopharm* 136, 341-346.
74. Smolenski, I.J.; Silinis, H.; Farnsworth, N.R. 1975. Alkaloid screening. VI. *Lloydia* 38, 225-56.
75. Tasaka, A.C., Weg, R., Calore, E.E., Sinhorini, I.L., Dagli, M.L.Z., Haraguchi, M., Górnaiak, S.L. 2000. Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. *Vet Res Commun*, 24, 573-582.
76. Tokarnia, H.C.; Döbereiner, J.; Peixoto, P.V. 2000. Plantas toxicas do Brasil, Ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p 145-150.

77. Tokarnia C.H, Brito M, Barbosa J.D, Peixoto P.V, Dobereiner J. 2012. Plantas Tóxicas Do Brasil para animais de Produção. Editora Helianthus. Rio de Janeiro. 2da Edición. 295-301.
78. Troiani, H.P.; Steibel, A.O. Prina; Alfonso, G.L. 1994. Catálogo preliminar de la flora de La Pampa. VI Jornadas Latinoamericanas de Botánica. Mar del Plata. Argentina.
79. Vallejo, L.C. 1980. Plantas tóxicas: Intoxicaciones en el Ganado. Anuales: Sociedad Rural Argentina. 6: 18-21.
80. Van Vleet, P.; Valentine, M. 2007. Muscle and tendons. In: MAXIE, M. G. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier.1, pp492-493.
81. Vashishtha, V.M., John, T.J., Amod Kumaret. 2009. Clinical & pathological features of acute toxicity due to *Cassia occidentalis* in vertebrates Indian J Med Res, 130, 23-30.
82. Vashishtha, V. M., Kumar, A., John, T. J., Nayak, N. C. 2007b. *Cassia occidentalis* poisoning as the probable cause of hepatomyoencephalopathy in children in western Uttar Pradesh. Indian J Med Res, 125, 756-762.
83. Vashishtha, V. M., Nayak, N. C., John, T. J., Kumar, A. 2007a. Recurrent annual outbreaks of a hepato-myo-encephalopathy syndrome in children in western Uttar Pradesh, India. Indian J Me Res, 125, 523.
84. Vieites, C. M. 1997. Producción porcina: estrategias para una actividad sustentable (No. 636.4). Hemisferio Sur. pp. 49, 56.
85. Wendt M, Bickhardt K, Herzog A, Fischer A, Martens H, Richter T. 2000. Porcine stress syndrome and PSE meat: clinical symptoms, pathogenesis, etiology and animal rights aspects. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. May;113, 173-90.
86. Yadav, J.P.; Arya, V.; Yadav, S.; Panghal, M.; Kumar, S.; Dhankhar, S. 2010. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. Fitoterapia. 81, 223-230.
87. Yahaya, T., Shehu, K., Isah, H., Oladele, E., & Shemishere, U. 2019. Toxicological evaluation of the leaves of *Guiera senegalensis* (JF Gme), *Cassia occidentalis* (Linn), and *Ziziphus mauritiana* (Lam). Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 8(1), 1-9.