



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Veterinarias

**Estudios clínicos, anatomopatológicos y
enzimáticos sobre la toxicidad de hojas y frutos de
Melia azedarach para bovinos, ovinos y cerdos**

Presentado por la Med. Vet. María del Carmen Méndez González

Director: Dr. Eduardo J. Gimeno
Codirector: Dr. Enrique L. Portiansky

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Parcialmente realizado en la Cátedra de Toxicología y Plantas Tóxicas, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Pelotas, Río Grande del Sur, Brasil y la Cátedra de Patología General Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Miembros del Jurado: Dr. Odriozola, Ernesto
Dr. Perfumo, Carlos Juan
Dr. Idiart, Julio Roberto

2003

Dedicatoria

A mi hijo, que llegó durante la realización de esta tesis, y que con su mirada fuerte me dio alegría, fuerza, coraje, me hizo comprender la importancia de vivir, luchar, caminar hacia el futuro y lo más importante, me permitió sentir esa maravillosa sensación de amor dentro de mí.

A mi madre, que nunca midió esfuerzos para que yo alcanzara mi realización profesional.

A la memoria de mi padre, a quien extraño.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Al Consejo de Desenvolvimiento Científico y Tecnológico (CNPq), a la Fundación de Amparo a la Pesquisa de Río Grande del Sur (FAPERGS) y PRONEX (Programa de Núcleos de Excelencia) por el soporte financiero para la realización de este estudio.

Al Doctor Severo Barros por la ayuda en el estudio por microscopía electrónica y, principalmente, por su constante interés y dedicación durante la realización de los estudios experimentales.

Un agradecimiento especial a los Doctores Eduardo J. Gimeno y Enrique L. Portiansky por la dirección y co-dirección de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

Trabajos derivados de la presente tesis:	6
<i>Publicaciones</i>	6
<i>Presentaciones en reuniones científicas</i>	6
A. RESUMEN	7
B. PALABRAS CLAVE	7
C. SUMMARY	8
D. KEYWORDS	8
E. INTRODUCCIÓN	9
<i>E.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA INTOXICACIÓN</i>	9
E.1.1. Especies afectadas	9
E.1.2. Signos clínicos	9
E.1.3. Lesiones macroscópicas y microscópicas	10
<i>E.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PLANTA TÓXICA</i>	11
<i>E.3. TOXICIDAD Y PRINCIPIO TÓXICO</i>	13
F. OBJETIVOS	15
<i>OBJETIVOS GENERALES</i>	15
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	15
G. MATERIALES Y MÉTODOS	16
<i>G.1. MATERIALES</i>	16
G.1.1 Determinaciones enzimáticas	16
G.1.2. Estudio histológico	17
G.1.3. Estudios de microscopía electrónica	17
<i>G.2. EXPERIMENTOS CON BOVINOS</i>	18
G.2.1. Intoxicación experimental con frutos de <i>M. azedarach</i>	18
G.2.2. Intoxicación experimental con hojas de <i>M. azedarach</i>	19
<i>G.3. EXPERIMENTOS CON OVINOS</i>	21
G.3.1. Intoxicación experimental con frutos de <i>M. azedarach</i>	21
G.3.2. Intoxicación experimental con hojas de <i>M. azedarach</i>	22
<i>G.4. EXPERIMENTOS CON CERDOS</i>	23
<i>G.5. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS</i>	23
H. RESULTADOS	25
<i>H.1. EXPERIMENTOS CON BOVINOS</i>	25
H.1.1. Datos clínicos	25
<i>H.1.1.1. Intoxicación experimental con frutos de M. azedarach</i>	25
<i>H.1.1.2. Intoxicación experimental con hojas de M. azedarach</i>	30
H.1.2. Lesiones en los bovinos	34
<i>H.1.2.1. Hallazgos macroscópicos</i>	34

<i>H.1.2.1. Hallazgos microscópicos.....</i>	<i>34</i>
H.2. EXPERIMENTOS CON OVINOS.....	41
II.2.1. Datos clínicos	41
H.2.1.1. <i>Intoxicación experimental con frutos de M. azedarach.....</i>	<i>41</i>
H.2.1.2. <i>Intoxicación experimental con hojas de M. azedarach.....</i>	<i>45</i>
H.2.2. Lesiones en los ovinos	49
H.2.2.1. <i>Hallazgos macroscópicos</i>	<i>49</i>
H.2.2.2. <i>Hallazgos microscópicos.....</i>	<i>49</i>
H.3. EXPERIMENTOS CON CERDOS.....	51
H.3.1. Datos clínicos	51
H.3.2. Lesiones en los cerdos.....	55
H.3.2.1. <i>Hallazgos macroscópicos</i>	<i>55</i>
H.3.2.2. <i>Hallazgos microscópicos.....</i>	<i>55</i>
I. DISCUSIÓN	56
J. CONCLUSIONES.....	63
K. BIBLIOGRAFÍA.....	65

Trabajos derivados de la presente tesis:

Publicaciones

MÉNDEZ, M.C.; ARAGÃO, M.; ELIAS, F.; RIET-CORREA, F. and GIMENO, E.J. (2002) Experimental intoxication by leaves of *Melia azedarach* in cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 22:19-24.

MÉNDEZ, M.C.; ELIAS, F.; ARAGÃO, M.; GIMENO, E.J. and RIET-CORREA, F. (2002) Experimental intoxication by fruits of *Melia azedarach* in cattle. *Vet. Human. Toxicol.* 44:145-148.

Presentaciones en reuniones científicas

BUTTINI, M.G.; ELIAS, F. e MÉNDEZ, M.C. (1999) Intoxicação experimental com frutos de cinamomo (*Melia azedarach*) em suínos. 8º Congresso de Iniciação Científica. Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, Brasil. p: 286.

BUTTINI, M.G.; ELIAS, F.; ARAGÃO, M. e MÉNDEZ, M.C. (1999) Toxicidade de *Melia azedarach* para bovinos. 8º Congresso de Iniciação Científica. Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, Brasil. p: 277.

ARAGÃO, M.; ELIAS, F. e MENDEZ, M.C. (2000) Intoxicação experimental por frutos de *Melia azedarach* em bovinos. 9º Congresso de Iniciação Científica. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. p: 603.

MÉNDEZ, M.C.; ELIAS, F.; ARAGÃO, M.C.; PORTIANSKY, E.L.; GIMENO, E.J. e RIET-CORREA, F. (2002) Intoxicação experimental em suínos com frutos de *Melia azedarach*. Tercera Reunión Argentina de Patología Veterinaria (3º RAPAVE). Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Sta. Fe. Argentina. Memorias de la Tercera RAPAVE, p: 68.

A. RESUMEN

Hojas y frutos de *Melia azedarach* (*M. azedarach*) (paraíso) fueron administrados a bovinos y ovinos y solo frutos a cerdos, para determinar su toxicidad, estudiar los signos clínicos que estos inducen y las lesiones inducidas por la intoxicación en esas especies. Los frutos y las hojas fueron tóxicos para los bovinos. Dosis de 25 g/kg de frutos y 30 g/kg de hojas fueron letales. Los signos clínicos se caracterizaron por apatía, atonía ruminal, temores musculares, incoordinación e hipotermia. Se observaron signos de diarrea en los bovinos intoxicados con frutos y en los bovinos que ingirieron dosis no letales de hojas, mientras que los animales intoxicados con dosis letales de hojas presentaron heces secas y sanguinolentas. En los ovinos los principales signos fueron apatía, atonía ruminal y diarrea. No se observaron signos nerviosos. Los frutos fueron letales en dosis de 35 g/kg y las hojas no causaron la muerte del animal ni aún con dosis de 30 g/kg. En los cerdos, los principales signos clínicos inducidos por los frutos fueron incoordinación, temores musculares, dificultad de mantenerse en pie o para levantarse, decúbito esternal e hipotermia. La diarrea sólo se observó en 3 cerdos que consumieron dosis de 5 y 15 g/kg. La dosis letal fue de 20 g/kg de frutos.

Las alteraciones macroscópicas fueron inespecíficas en todos los casos. Las alteraciones microscópicas se caracterizaron por necrosis del tejido linfático, necrosis de los músculos esqueléticos y alteraciones degenerativas moderadas en el hígado y en el riñón. En los bovinos se observó, además, degeneración y necrosis en rumen e intestino. Los niveles séricos de AST y CPK aumentaron después de la ingestión del tóxico. Se observaron valores altos de CPK en la mayoría de los animales que murieron, evidenciando la mionecrosis. Estos resultados demuestran que la ingestión de altas dosis de hojas y frutos de *M. azedarach* por parte de los bovinos y ovinos y de frutos por los cerdos, induce la aparición de síntomas de intoxicación y causa lesiones en diversos órganos, incluso su muerte.

B. PALABRAS CLAVE

Melia azedarach; intoxicación; plantas tóxicas; bovinos; ovinos; cerdos.

C. SUMMARY

Leaves and fruits of *Melia azedarach* (*M. azedarach*) (chinaberry) were administered to cattle and sheep and only fruits in pigs to determine their toxicity, to study the clinical signs and the lesions induced by the intoxication in those species.

The fruits and the leaves were toxic for cattle. Dose of 25 g/kg of fruits and 30 g/kg of leaves were lethal. The clinical signs were characterised by apathy, rumen atony, muscular tremors, incoordination and hypothermia. Diarrhoea was observed either in cattle intoxicated with fruits as well as in those bovines that ingested non-lethal dose of leaves, while animals intoxicated with lethal dose of leaves presented dry and bloody feces.

In sheep, the main signs were apathy, rumen atony and diarrhoea. Nervous signs were not observed. Doses of 35 g/kg of fruits were lethal for those animals while the leaves did not cause death in doses of up to 30 g/kg.

In pigs the main clinical signs after intoxication with fruits were incoordination, muscular tremors, difficulty of staying in foot or to get up, sternal decubitus and hypothermia. Diarrhoea was only observed in 3 pigs that consumed doses of 5 and 15 g/kg. The lethal dose was of 20 g/kg of fruits.

The macroscopic alterations were unspecific in all the cases. The microscopic alterations were characterised by necrosis of the lymphatic tissues, necrosis of the skeletal muscles and moderate degenerative alterations of the liver and kidney. In cattle, degeneration and necrosis in rumen and gut. The serum levels of AST and CPK increased after the ingestion of the toxic. High values of CPK were observed in most of the dying animals evidencing the mionecrosis. These results demonstrate that the ingestion of high doses of leaves and fruits of *M. azedarach* by cattle and sheep and fruits by pigs may induce clinical signs of intoxication and cause lesions of diverse organs and even death.

D. KEYWORDS

Melia azedarach; intoxication; toxic plants; cattle; sheep; pigs.

E. INTRODUCCIÓN

E.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA INTOXICACIÓN

E.1.1. Especies afectadas

La intoxicación inducida por *Melia azedarach* (*M. azedarach*) (paraíso) ha sido observada en el hombre y animales domésticos como consecuencia de la ingestión de sus hojas o frutos caídos. La forma más común de intoxicación en el hombre es a través de la ingestión de frutos. Los niños pueden morir después de ingerir 6 a 8 frutos. La muerte suele ser rápida pero puede demorar algunos días (9, 18, 23). La infusión preparada con las hojas o corteza del paraíso puede ser tóxica para el hombre adulto (9).

Los cerdos son los animales más afectados. No obstante, se mencionan casos de intoxicación en bovinos, ovinos, caprinos y aves domésticas (9, 23). La intoxicación en cerdos se observa, generalmente, por la ingestión espontánea de frutos maduros, cuando estos caen al suelo, o de gajos que están a su alcance (9), habiéndose reproducido la enfermedad a través de la administración de frutos molidos mezclados en la comida (19).

La intoxicación con *M. azedarach* en otras especies parece ser rara. Los ovinos pueden intoxicarse después de ingerir frutos de paraíso, mientras que los bovinos pueden enfermar por la ingestión de hojas de la planta, pero solamente si la pastura es escasa, está muy seca o no existe otro forraje disponible (9). Algunos autores consideran que los ovinos son muy resistentes a los frutos maduros (15), mientras que otros autores mencionan que tanto los ovinos como los cerdos son los animales más sensibles a la intoxicación (18).

La intoxicación con frutos se describe también en caninos (11), aunque, generalmente, estos no son afectados, debido a que vomitan el material ingerido antes de presentar signos clínicos de la enfermedad (9, 15).

E.1.2. Signos clínicos

Los signos clínicos en los animales domésticos, a excepción del cerdo, se manifiestan rápidamente, en 2 a 4 horas y se relacionan con el sistema gastrointestinal y/o sistema nervioso. Se pueden observar signos clínicos de anorexia, náuseas, vómitos, cólicos,

constipación o diarrea, frecuentemente sanguinolenta, síntomas nerviosos de excitación o depresión, pulso cardíaco débil, convulsiones, paresia, disnea y coma con colapso circulatorio e insuficiencia respiratoria (9, 18, 12, 23). Según Hare, los animales intoxicados con frutos de *M. azedarach* no sobreviven más de 48 horas después de la aparición de los signos clínicos (12).

En los cerdos se describen dos tipos de signos: a) náuseas, vómitos, constipación o diarrea hemorrágica; o b) signos nerviosos de excitación o depresión, disnea, ritmo cardíaco débil y muerte. Los signos clínicos pueden aparecer en pocas horas después de la ingestión. La muerte sobreviene, generalmente, dentro de las 24 horas, aunque en ciertas ocasiones puede retardarse algunos días. Los animales menos afectados pueden tener una recuperación lenta (18, 23, 29).

Los síntomas de la intoxicación observados en el hombre son náuseas, vómitos, diarrea, sed, sudoración, rechinar de dientes, somnolencia y convulsiones (9, 18, 23).

E.1.3. Lesiones macroscópicas y microscópicas

Las lesiones macroscópicas inducidas por la intoxicación con *M. azedarach* no son específicas: la congestión hepática y renal severa y difusa es el hallazgo más común (13). En los casos agudos se observa solamente enrojecimiento de la mucosa gastrointestinal (18, 23).

En animales que sobreviven algunos días, se observan lesiones histológicas de degeneración grasa e hiperemia hepática y renal (18, 23). En los cerdos, los hallazgos microscópicos más característicos se observan principalmente en el intestino delgado. La lesión, consistente en la necrosis de las células del tejido conectivo interglandular de la lámina propia, comienza en el área glandular del estómago y se extiende al intestino delgado. Se observan también cilindros hialinos en los túbulos renales y necrosis de linfocitos en los linfonodos y en el bazo (19, 23).

En ratas alimentadas con hojas secas de *M. azedarach* las lesiones histológicas observadas fueron de degeneración y necrosis de las fibras musculares esqueléticas (2). No obstante, en estos estudios no realizaron determinaciones de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y creatina fosfoquinasa (CPK), indicadoras de daño muscular. Tampoco se

encontraron antecedentes bibliográficos acerca de la presencia de lesiones musculares inducidas por esta planta en otras especies.

E.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PLANTA TÓXICA

M. azedarach es un árbol ornamental de crecimiento rápido y distribución mundial (18) (Fig. 1). Es nativo de Persia, India y China y actualmente aclimatado a diversas regiones como África, América del Sur, Australia, Nueva Zelanda, Indonesia, Japón, Sur de Estados Unidos, Hawai y Bermuda. Alcanza una altura de 6 a 12 m y algunas variedades pueden superar los 20 m de altura (11, 15, 18, 23). En Australia, el árbol puede alcanzar 45 m de altura en la floresta húmeda, pero cuando crece en condiciones más abiertas se presenta de menor altura. El paraíso es considerado nativo de la floresta húmeda del Este de Australia y del Nordeste de Nueva Gales del Sur, al Norte de Queensland, extendiéndose hasta Nueva Guinea. Es plantado para la obtención de sombra y como ornamental, principalmente en las áreas subtropicales del oeste de Queensland y en Nueva Gales del Sur (9).

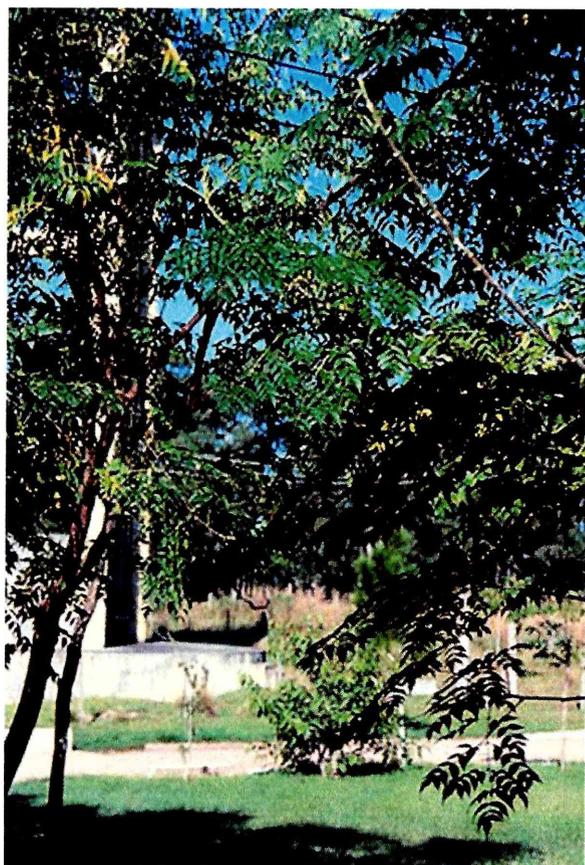


Fig. 1. Árbol de *Melia azedarach* (*M. azedarach*) (paraíso). Municipio de Capão do Leão. Río Grande del Sur. Brasil.

Fig. 2. Hojas y frutos de *M. azedarach*

En la Argentina, el paraíso es cultivado en la región templado-cálida y subtropical. Es utilizado como árbol de sombra y en el arbolado de calles, plazas y caminos (10). En Brasil, la planta está ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales.

Las hojas del paraíso son de color verde oscuro, relativamente anchas, alternas y bipennadas. Las flores se presentan en racimo. Son axilares o terminales, de color violeta o lila y están compuestas por 5 a 6 pétalos pequeños. Los árboles producen muchos frutos que, cuando maduran, caen al suelo durante un corto período. Los frutos, inicialmente verdes, son redondos a ovales, midiendo aproximadamente 1,5 cm de diámetro. El fruto maduro es de color amarillo pálido, algunas veces con nervaduras semejantes a un carozo (11) (Fig. 2).

En algunos países, este árbol es utilizado con fines medicinales para el tratamiento de diversos trastornos en el hombre. Ha sido utilizado como antihelmíntico, tónico, antipirético y también para el tratamiento de la lepra, del eczema y del asma (23). Las hojas del paraíso tienen propiedades insecticidas. Debido a esta característica, en la Argentina fue plantado en diversas provincias, ya que era el único árbol que no era comido por las langostas. Por esta misma razón los potreros estaban frecuentemente rodeados con esos árboles (10, 25).

E.3. TOXICIDAD Y PRINCIPIO TÓXICO

Experimentalmente, los frutos son tóxicos para cerdos y, en menor grado, para las aves domésticas, ovinos y caprinos. La corteza, las flores y las hojas son también tóxicas, pero la toxicidad es menor que la de los frutos. Los frutos maduros son más tóxicos que los verdes (15).

La dosis tóxica para cerdos es de aproximadamente un 0,7% de su peso vivo (15). Kingsbury (18) considera que una dosis equivalente a 0,5% del peso vivo es tóxica tanto para cerdos como para ovinos. En Nueva Gales del Sur, Australia, los frutos de *M. azedarach* son considerados inofensivos para los pájaros nativos. Se considera que la porción tóxica del fruto es la semilla y que, por lo tanto, las otras partes pueden ser ingeridas por los pájaros sin perjuicio. Los cobayos son también experimentalmente sensibles a los frutos de paraíso (15).

Factores ambientales tales como área geográfica, clima y condiciones locales del tiempo, así como algunas condiciones de crecimiento de la planta, pueden influir sobre la toxicidad de los árboles (15). Sin embargo, algunas plantas pueden no ser tóxicas (22, 23). Hurst (15) menciona que en la Argentina los frutos son ingeridos por los niños y los animales domésticos sin que ocurran casos de intoxicación. En algunas regiones del estado de Río Grande del Sur, en Brasil, algunos criadores también mencionan que bovinos y ovinos ingieren gajos de paraíso sin enfermar.

El aislamiento y caracterización de las sustancias tóxicas relacionadas con la intoxicación con *M. azedarach* se realiza desde hace mucho tiempo. En 1929 se pensaba que la toxicidad estaba asociada con el sabor agri dulce de la planta y de los frutos. Luego, en 1932, Morrison y Grant (20) determinaron que el principio tóxico estaba en la porción resinosa de los frutos

y era una sustancia de tipo alcaloide de estructura desconocida. En 1939, los análisis químicos indicaron que los frutos contenían un alcaloide (azedarina), una resina, tanino y ácidos meliotánico y benzoico (7). Más recientemente fueron identificadas 4 sustancias, extraídas de los frutos de *M. azedarach*, clasificadas químicamente como tetranortriterpenos y denominadas meliatoxinas A1, A2, B1 y B2. Los autores sugieren que esas sustancias son responsables de los signos nerviosos de la enfermedad, ya que su administración a cerdos indujo la aparición de signos clínicos y lesiones similares a las observadas en los casos agudos de intoxicación con los frutos de la planta. Cuando los animales consumen dosis no letales de frutos frescos se observa un cuadro de diarrea hemorrágica con un curso clínico de algunos días. Este cuadro no fue observado en cerdos intoxicados con meliatoxinas. Otra sustancia aislada, pero aún no identificada, sería responsable de los signos digestivos (23). En Brasil, en el Estado de Río Grande del Sur, se observan casos de intoxicación inducidos por *M. azedarach* en cerdos que tienen acceso a los frutos que caen de los árboles (28). Los criadores informan que, en ciertas ocasiones, también ocurren muertes de bovinos y ovinos asociadas con la ingestión de frutos que caen de los árboles u hojas de gajos o árboles derrumbados por el viento o después de la poda.

F. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Profundizar los conocimientos referidos a la patogenia de la intoxicación experimental con *M. azedarach*.
- Caracterizar marcadores séricos indicativos de lesión muscular, originados por la intoxicación experimental con *M. azedarach*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la toxicidad de hojas y frutos de *M. azedarach* en bovinos y ovinos.
- Establecer la toxicidad de frutos de *M. azedarach* en cerdos.
- Establecer la dosis tóxica de hojas y frutos de *M. azedarach* que pueda inducir signología clínica y/o la muerte de bovinos y ovinos en experimentación.
- Establecer la dosis tóxica de frutos de *M. azedarach* que pueda inducir signología clínica y/o la muerte de cerdos en experimentación.
- Caracterizar las lesiones macro y microscópicas inducidas por la ingestión de hojas y frutos de *M. azedarach* en bovinos y ovinos.
- Caracterizar las lesiones macro y microscópicas inducidas por la ingestión de frutos de *M. azedarach* en cerdos.
- Determinar los valores de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y creatinina fosfoquinasa (CPK) previos y posteriores a la intoxicación de bovinos, ovinos con hojas y frutos de *M. azedarach*.
- Determinar los valores de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y creatinina fosfoquinasa (CPK) previos y posteriores a la intoxicación de cerdos con frutos de *M. azedarach*.

G. MATERIALES Y MÉTODOS

G.1. MATERIALES

Las hojas y los frutos de *M. azedarach* fueron recogidos de árboles localizados en proximidad de la Facultad de Veterinaria, en el Campus Universitario de la Universidad Federal de Pelotas, municipio de Capão do Leão, Río Grande del Sur, Brasil.

Las hojas fueron administradas en forma manual a los animales, inmediatamente luego de su recolección, en estado verde y en dosis única. Los frutos maduros de paraíso fueron triturados y administrados manualmente a bovinos y ovinos. Los cerdos recibieron los frutos molidos mezclados con la ración comercial. Los experimentos con las hojas fueron realizados en los meses de abril y mayo. Los frutos maduros fueron recogidos en junio y julio.

G.1.1 Determinaciones enzimáticas

Se extrajo sangre por punción de la vena yugular de todos los bovinos y ovinos estudiados y de la vena cava en los cerdos tratados y sus respectivos controles, para la determinación de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y creatina fosfoquinasa (CPK) o creatina kinasa (CK). La CPK es una enzima indicadora de lesión muscular y cerebral. Si bien la AST no es una enzima específica del daño muscular, ya que se encuentra, además, en hígado y otros tejidos, puede ser utilizada como ayuda en el diagnóstico de daño muscular. La AST también es conocida como transaminasa sérica glutámico oxalacética (SGOT). Todas las muestras fueron tomadas 24 horas previas al comienzo del experimento y luego, cada 24 horas posteriores a la ingestión de las hojas o frutos del árbol, durante 3 días. El mismo protocolo se aplicó sobre los animales controles, para tener un valor medio de la actividad enzimática durante el período del experimento. Las muestras de sangre fueron enviadas a un laboratorio privado de la ciudad de Pelotas, para la determinación, por el método cinético, de la actividad de la AST y de la CPK. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Alemana de Química Clínica (27).

G.1.2. Estudio histológico

En los animales que murieron como consecuencia de la intoxicación, en aquellos que fueron sacrificados *in extremis* y en aquellos que fueron sacrificados luego de haber sobrevivido más allá de las 72 horas posteriores a la ingestión de frutos y hojas, se practicó una necropsia completa, extrayendo muestras de diversos tejidos incluidos el pulmón, corazón, hígado, riñón, linfonodos (mesentéricos), rumen, omaso, abomaso, estómago, intestino delgado y grueso, bazo, sistema nervioso central y músculos esqueléticos (serrato, largo dorsal, semitendinoso, semimembranoso, psoas, intercostales, bíceps, tríceps y diafragma). Los materiales fueron fijados en formol al 10% y embebidos en parafina, cortados en secciones de 6 μm y teñidos por la técnica de hematoxilina-eosina, para el estudio histológico. Las muestras de los músculos esqueléticos fueron sumergidos en solución salina durante 40 a 50 minutos y posteriormente refrigerados a 4°C durante 12 horas, antes de ser fijados en formol; de esta manera, se evita la formación de artefactos producidos por la rigidez cadavérica.

G.1.3. Estudios de microscopía electrónica

Muestras de los músculos esqueléticos y de los linfonodos fueron extraídas de los bovinos N° 8 y N° 10, intoxicados con 25 y 30 g/kg de frutos, respectivamente; del bovino N° 11, intoxicado con 30 g/kg de hojas; del ovino N° 10, intoxicado con 35 g/kg de frutos y del cerdo N° 8 (20 g/kg) para el estudio realizado por microscopía electrónica. Las muestras fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en tampón cacodilato de sodio (0,03 M, pH 7,4), posfijados en tetróxido de ósmio al 1% y embebidos en Epon 812. Los cortes semifinos fueron coloreados con azul de metileno. Las áreas seleccionadas fueron cortadas con cuchilla de diamante. Los cortes contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo fueron observados mediante un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109 a 80 Kv.

G.2. EXPERIMENTOS CON BOVINOS

G.2.1. Intoxicación experimental con frutos de *M. azedarach*

Para este experimento se utilizaron 12 bovinos machos Holstein de 4 a 15 meses de edad y de pesos comprendidos entre 67 y 154 kg. Diez bovinos recibieron los frutos, mientras que 2 bovinos fueron mantenidos como controles, permaneciendo junto con los animales experimentales, en las mismas condiciones ambientales y alimentados con la misma ración comercial (heno de alfalfa). Los animales fueron sometidos a un examen clínico previo al comienzo del experimento y, diariamente, luego de la ingestión de los frutos. El examen consistió en la evaluación de la frecuencia cardíaca y respiratoria, movimientos ruminales, temperatura corporal, coloración de las mucosas, consistencia y coloración de las heces y aspecto general. El examen de los signos clínicos fue realizado hasta la muerte del animal o 10 días posteriores al comienzo de la intoxicación.

Los frutos maduros de *M. azedarach* fueron triturados y administrados manualmente, por vía oral, en dosis única de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 g/kg de peso vivo. La Tabla 1 muestra el peso de los animales utilizados en este experimento y las dosis de frutos administradas.

Bovino (Nº)	Peso (Kg)	Dosis de frutos (g/Kg)
1	71	5
2	85	10
3	148	15
4	154	15
5	70	20
6	106	20
7	67	25
8	102	25
9	99	30
10	98	30
11 (control)	90	-
12 (control)	120	-

Tabla 1. Peso corporal y dosis de frutos de *M. azedarach* administradas a bovinos

G.2.2. Intoxicación experimental con hojas de *M. azedarach*

Once bovinos fueron intoxicados con hojas verdes mientras que 2 animales permanecieron como controles, siendo mantenidos junto con los animales experimentales en las mismas condiciones ambientales. Los bovinos eran machos Holstein de 4 a 15 meses de edad y de pesos comprendidos entre 65 y 158 kg. El examen clínico, realizado en todos los animales, fue conducido de la misma forma como fuera descrito en el apartado G.2.1.

Las hojas verdes de *M. azedarach*, recogidas en el otoño, fueron administradas manualmente, por vía oral, en dosis única de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 g/kg de peso vivo. En la Tabla 2 se presentan el peso de los animales y las dosis de hojas administradas.

Bovino (Nº)	Peso (Kg)	Dosis de hojas (g/Kg)
1	115	5
2	70	10
3	121	15
4	158	15
5	65	20
6	112	20
7	132	25
8	130	25
9	125	30
10	100	30
11	130	30
12 (control)	100	-
13 (control)	110	-

Tabla 2. Peso corporal y dosis de hojas de *M. azedarach* administradas a bovinos

G.3. EXPERIMENTOS CON OVINOS

G.3.1. Intoxicación experimental con frutos de *M. azedarach*

Los frutos de *M. azedarach* fueron administrados a 10 ovinos machos Corriedale de 6 a 18 meses de edad y de pesos comprendidos entre 23 y 37 kg, mientras que 2 ovinos permanecieron como controles. Se practicó un examen clínico a todos los animales, previo al inicio del experimento y, diariamente, después de la ingestión de los frutos. El examen de los signos clínicos fue realizado hasta la muerte del animal o 10 días posteriores al comienzo de la intoxicación. Se evaluó la frecuencia cardíaca y respiratoria, movimientos ruminales, temperatura corporal, coloración de las mucosas, consistencia y coloración de las heces y aspecto general.

Los frutos maduros fueron triturados y administrados manualmente, por vía oral, en dosis única de 15, 20, 25, 30 o 35 g/kg de peso vivo. El peso de los animales utilizados en este experimento y las dosis de intoxicación son presentados en la Tabla 3.

Ovino (Nº)	Peso (Kg)	Dosis de frutos (g/Kg)
1	28	15
2	28	15
3	24	20
4	27,5	20
5	31	25
6	37	25
7	23	30
8	31,5	30
9	35	35
10	23,5	35
11 (control)	28	-
12 (control)	30	-

Tabla 3. Peso corporal y dosis de frutos de *M. azedarach* administradas a ovinos

G.3.2. Intoxicación experimental con hojas de *M. azedarach*

En este experimento se utilizaron 10 ovinos machos Corriedale de 4 a 15 meses de edad y de pesos comprendidos entre 12 y 35 kg; ocho ovinos recibieron hojas verdes mientras que 2 animales permanecieron como controles. El examen clínico, realizado en todos los animales, fue conducido de la forma anteriormente descrita (G.3.1).

Las hojas verdes fueron administradas manualmente, por vía oral, en dosis única de 15, 20, 25 o 30 g/kg de peso vivo. El peso de los animales utilizados en este experimento y las dosis de hojas administradas pueden observarse en la Tabla 4.

Ovino (Nº)	Peso (Kg)	Dosis de hojas (g/Kg)
1	18	15
2	12	15
3	20	20
4	35	20
5	34	25
6	23	25
7	21	30
8	18,5	30
9 (control)	30	-
10 (control)	25	-

Tabla 4. Peso corporal y dosis de hojas de *M. azedarach* administradas a ovinos

G.4. EXPERIMENTOS CON CERDOS

Los frutos maduros fueron triturados, mezclados en la ración (alimento balanceado) y administrados a 8 cerdos machos Landrace de 60 a 120 días de edad y de pesos comprendidos entre 8 y 26 kg, en dosis de 5, 10, 15 o 20 g/kg de peso vivo. Los animales fueron mantenidos en ayuno previo, por un período de 24 horas. Dos cerdos fueron utilizados como controles.

En la Tabla 5 se presentan el peso de los cerdos y las dosis de frutos de paraíso administradas.

Cerdo (Nº)	Peso (Kg)	Dosis (g/Kg)
1	8	5
2	10	5
3	16	10
4	22	10
5	26	15
6	8	15
7	18	20
8	8	20
9 (control)	25	-
10 (control)	20	-

Tabla 5. Peso corporal y dosis de frutos de *M. azedarach* administradas a cerdos

G.5. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Dado que la cantidad de animales analizados por cada dosis y dentro de cada especie fue muy baja y que las observaciones realizadas sobre los mismos fueron de tipo clínico y anatomopatológico, no pudo implementarse ningún estudio estadístico riguroso. No obstante, se realizó un estudio de correlación entre la dosis de hojas y frutos administrados a

cada especie y los valores enzimáticos obtenidos, así como un estudio de varianza entre los valores obtenidos para cada tiempo de observación, dosis de hojas y frutos de cada una de las especies y enzimas estudiadas.

El coeficiente de correlación mide el grado en que las secuencias de datos varían juntas u opuestamente. A la correlación positiva máxima le corresponde un valor de 1,00. Dado que la correlación es el promedio del producto de los resultados estandarizados para los casos de dos variables y dado que el desvío standard es 1,00, entonces si las dos variables estandarizadas covarían positiva o negativamente y perfectamente, el promedio de sus productos en todos los casos será igual a 1,00. Cuando el resultado de la correlación tiende a 0 (cero), simplemente significa que dos cosas varían separadamente. Por lo tanto, una correlación de 0 representa la independencia completa mientras que -1,00 o 1,00 indican la dependencia completa (26).

En nuestro trabajo, la correlación de $r > 0,5$ (valores absolutos) fue considerada como significativa. Para la prueba de varianza, un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

H. RESULTADOS

H.1. EXPERIMENTOS CON BOVINOS

H.1.1. Datos clínicos

*H.1.1.1. Intoxicación experimental con frutos de *M. azedarach**

Todos los bovinos que consumieron frutos de *M. azedarach* manifestaron signos clínicos, que consistieron inicialmente en apatía y atonía ruminal. En el bovino N° 4 (intoxicado con 15 g/kg de frutos) se observó, 48 horas después de la ingestión de los frutos, atonía ruminal, hipotermia, temores musculares, incoordinación de los miembros posteriores y posición de decúbito esternal.

En los bovinos que recibieron dosis de 20 g/kg también se observaron temores musculares, incoordinación motora, anorexia y diarrea. El bovino N° 5 mostró una diarrea severa, 24 horas posteriores a la ingestión del tóxico, mientras que el animal N° 6 manifestó diarrea, también severa, a las 48 horas.

En los animales que recibieron dosis de 25 o 30 g/kg, además de los signos clínicos mencionados anteriormente, se observó decúbito esternal y disnea severa. La muerte ocurrió entre 20 y 48 horas después de la ingestión de los frutos. El bovino N° 9 (30 g/kg) no presentó diarrea. La Tabla 6 muestra el tiempo transcurrido entre la ingestión de los frutos y el inicio de los signos clínicos, la duración de los mismos y la evolución de la enfermedad, para cada una de las dosis administradas. Por su parte, la Tabla 7 muestra los signos clínicos observados en cada animal, luego de la ingestión de frutos. En los animales controles todos los parámetros clínicos evaluados fueron normales.

Bovino (Nº)	Dosis de frutos (g/Kg)	Signos clínicos		Evolución
		Inicio	Duración	
1	5	24h	72h	Sobrevivió
2	10	24h	48h	Sobrevivió
3	15	24h	48h	Sobrevivió
4	15	24h	72h	Murió
5	20	24h	72h	Sacrificado
6	20	24h	72h	Sobrevivió
7	25	15h	30h	Murió
8	25	8h	20h	Murió
9	30	4h	48h	Murió
10	30	8h	20h	Murió
11 (control)	0	----	----	Sobrevivió
12 (control)	0	----	----	Sacrificado

Tabla 6. Evolución de la intoxicación experimental de bovinos con frutos de *M. azedarach*.

N°	Dosis g/Kg	Signos clínicos									
		Apatía	Anorexia	Atonía ruminal	Diarrea	Tremores musculares	Incoordinación	Hipotermia	Disnea	Decúbito esternal	
1	5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	15	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7	25	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	25	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	30	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Signos clínicos observados en los bovinos después de consumir frutos de *M. azedarach*

Los signos positivos [+] indican la presencia del signo clínico; los signos negativos [-] indican su ausencia.

Los valores séricos de las enzimas AST y CPK se presentan en las figuras 3 y 4, respectivamente. De acuerdo a lo observado, los valores de AST en los animales control se mantuvieron en un mismo nivel en todas las muestras. Las muestras de animales intoxicados con 5, 10, 20 o 30 g/kg mostraron fluctuaciones cercanas a los valores normales. En los vacunos que recibieron 15 o 25 g/kg, los niveles de AST se incrementaron en forma progresiva. Si bien la cantidad de animales no permitió realizar un estudio estadístico certero, la prueba de varianza realizada en cada uno de los períodos analizados mostró que sólo se observaba una diferencia significativa, con respecto al control, a las 72 horas, en vacunos intoxicados con 15 g/kg. Por otra parte, los niveles de CPK mostraron resultados

similares, con la salvedad que ya a las 24 horas se detectaron marcadas diferencias entre los animales que recibieron 15 g/kg y los controles. A las 48 horas, dichas diferencias se mantuvieron y aparecieron, a su vez, en los bovinos que recibieron 25 o 30 g/kg.

La enzima AST mostró una correlación entre la dosis administrada y los niveles enzimáticos detectados, excepto para la dosis de 30 g/kg (Tabla 8). Cabe destacar la elevada correlación detectada para las dosis de 15 y 25 g/kg. Por su parte, se observó una correlación entre la dosis administrada y los valores enzimáticos de la CPK, con excepción de las dosis de 5 y 10 g/kg.

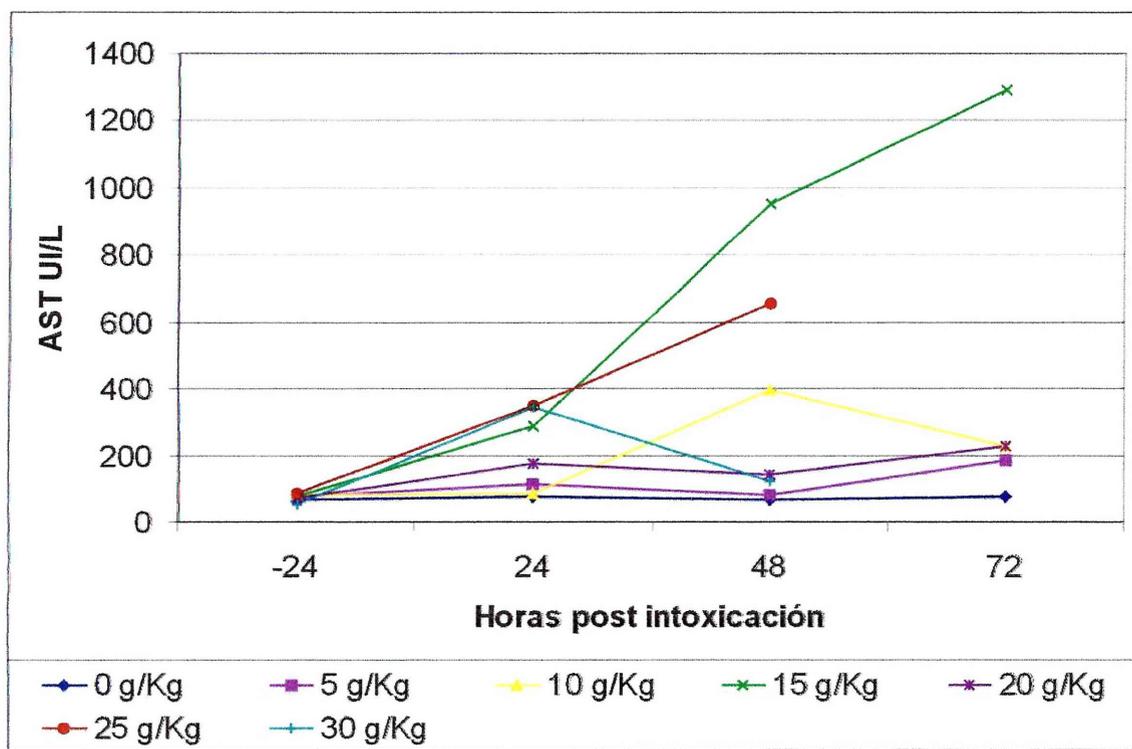


Fig. 3. Evolución de los valores séricos de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en bovinos intoxicados con frutos de *M. azedarach*.

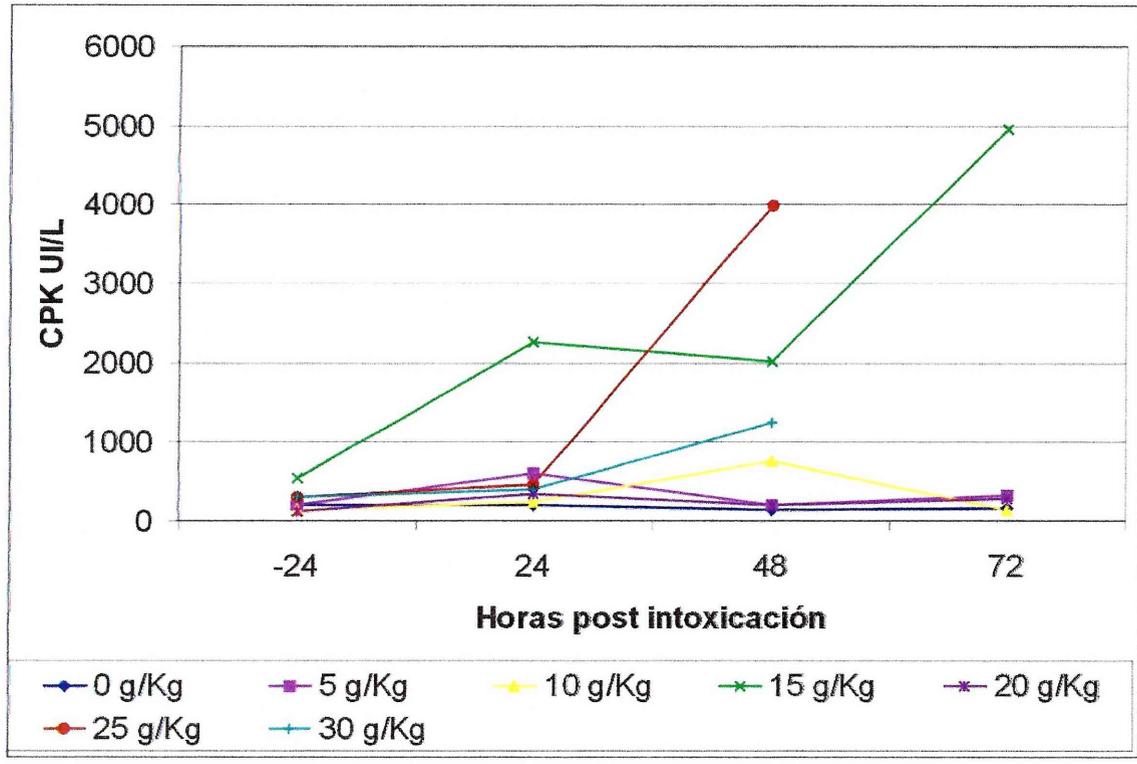


Fig. 4. Evolución de los valores séricos de la enzima creatinina fosfoquinasa (CPK) en bovinos intoxicados con frutos de *M. azedarach*.

Dosis (g/Kg)	AST	CPK
5	0,749	0,024
10	0,650	0,228
15	0,982	0,912
20	0,870	0,491
25	0,999	0,884
30	0,226	0,903

Tabla 8. Correlación entre las dosis de frutos de *M. azedarach* administradas a bovinos y los valores enzimáticos de AST y CPK. Los números indican el valor de *r*.

H.1.1.2. Intoxicación experimental con hojas de M. azedarach

La ingestión de hojas de paraíso, en distintas dosis, también produjo signología clínica en los bovinos. La Tabla 9 muestra el tiempo transcurrido entre la ingestión de las hojas y el inicio de los signos clínicos, la duración de los mismos y la evolución de la enfermedad.

Bovino N°	Dosis de hojas (g/Kg)	Signos clínicos		Evolución
		Inicio	Duración	
1	5	24h	24h	Sobrevivió
2	10	24h	48h	Sobrevivió
3	15	24h	24h	Sobrevivió
4	15	24h	24h	Sobrevivió
5	20	---	---	Sacrificado
6	20	---	---	Sobrevivió
7	25	8h	72h	Sacrificado
8	25	12h	72h	Sobrevivió
9	30	15h	2h	Murió
10	30	12h	36h	Murió
11	30	12h	24h	Murió
12 (control)	0	----	----	Sacrificado
13 (control)	0	----	----	Sobrevivió

Tabla 9. Evolución de la intoxicación experimental de bovinos con hojas de *M. azedarach*.

Los bovinos que ingirieron dosis de 30 g/kg de hojas verdes presentaron temores musculares, dificultad para mantenerse en pie, renuencia para levantarse cuando eran estimulados, decúbito esternal, hipotermia y dolor abdominal. En esos animales, las heces eran secas y sanguinolentas. La muerte ocurrió entre las 17 y 48 horas posteriores a la ingestión de las hojas.

Los bovinos que recibieron dosis de 25 g/kg de hojas presentaron, 24 horas después de la ingestión, diarrea, atonía ruminal e incoordinación de los miembros pelvianos.

El bovino N° 4 (15 g/kg) presentó diarrea, pero el animal N° 3 (15 g/kg) presentó heces duras e hipotermia.

No se observaron alteraciones clínicas relevantes en los controles (Tabla 10).

N°	Dosis g/Kg	Signos clínicos								
		Apatía	Atonía ruminal	Heces duras	Diarrea	Tremores musculares	Incoordinación	Hipotermia	Decúbito esternal	Dolores abdominales
1	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	10	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	15	+	+	+	-	-	-	+	-	-
4	15	+	+	-	+	-	-	-	-	-
5	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	25	-	+	-	+	-	+	-	-	-
8	25	-	+	-	+	-	+	-	-	-
9	30	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	30	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11	30	+	+	+	-	+	+	+	+	+
12	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 10. Signos clínicos observados en los bovinos después de consumir hojas verdes de *M. azedarach*. Los signos positivos [+] indican la presencia del signo clínico; los signos negativos [-] indican su ausencia.

Los valores séricos de las enzimas AST y CPK se presentan en las figuras 5 y 6, respectivamente. Se puede observar que las únicas diferencias significativas se presentaron a las 48 horas, en los sueros de los vacunos que recibieron 30 g/kg de hojas de *M. azedarach*.

La enzima AST mostró una correlación entre la dosis administrada y los niveles enzimáticos detectados, pero sólo para la dosis de 5 y 30 g/kg de hojas (Tabla 11). Por su parte, a excepción de las dosis de 10 y 15 g/kg, existió una correlación para el resto de las dosis administradas, cuando se midieron los niveles enzimáticos de la enzima CPK.

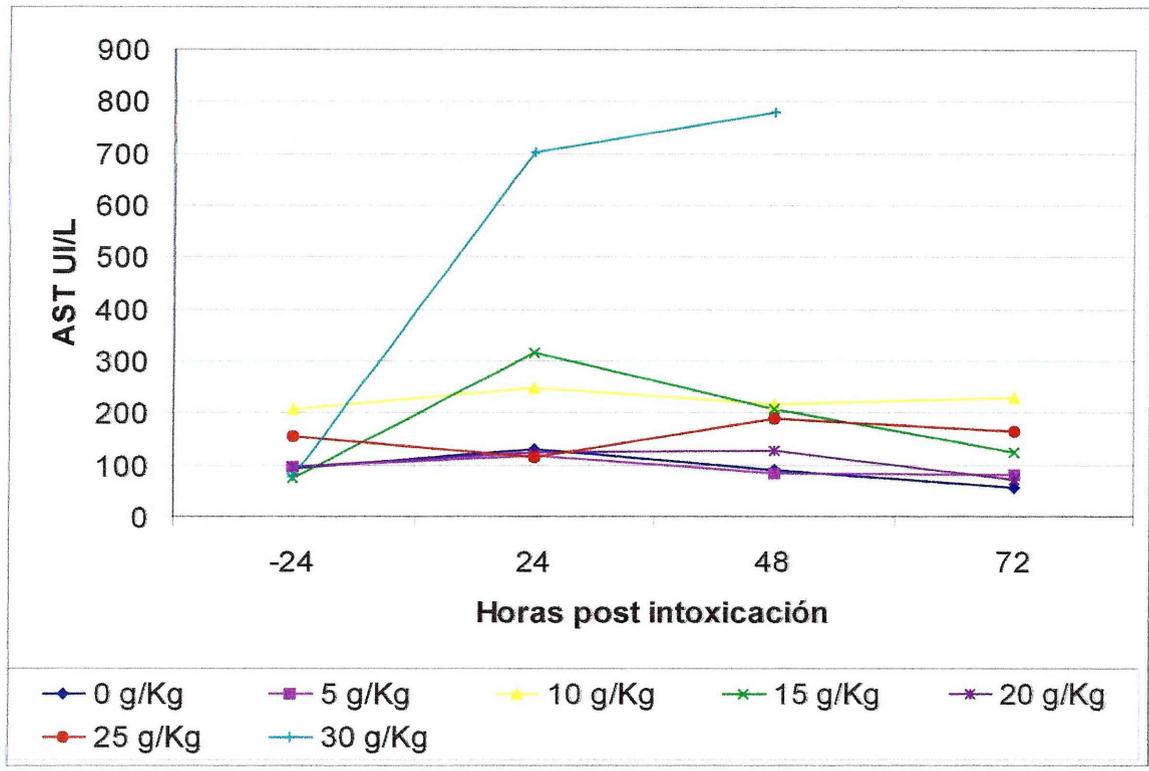


Fig. 5. Evolución de los valores séricos de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en bovinos intoxicados con hojas de *M. azedarach*.

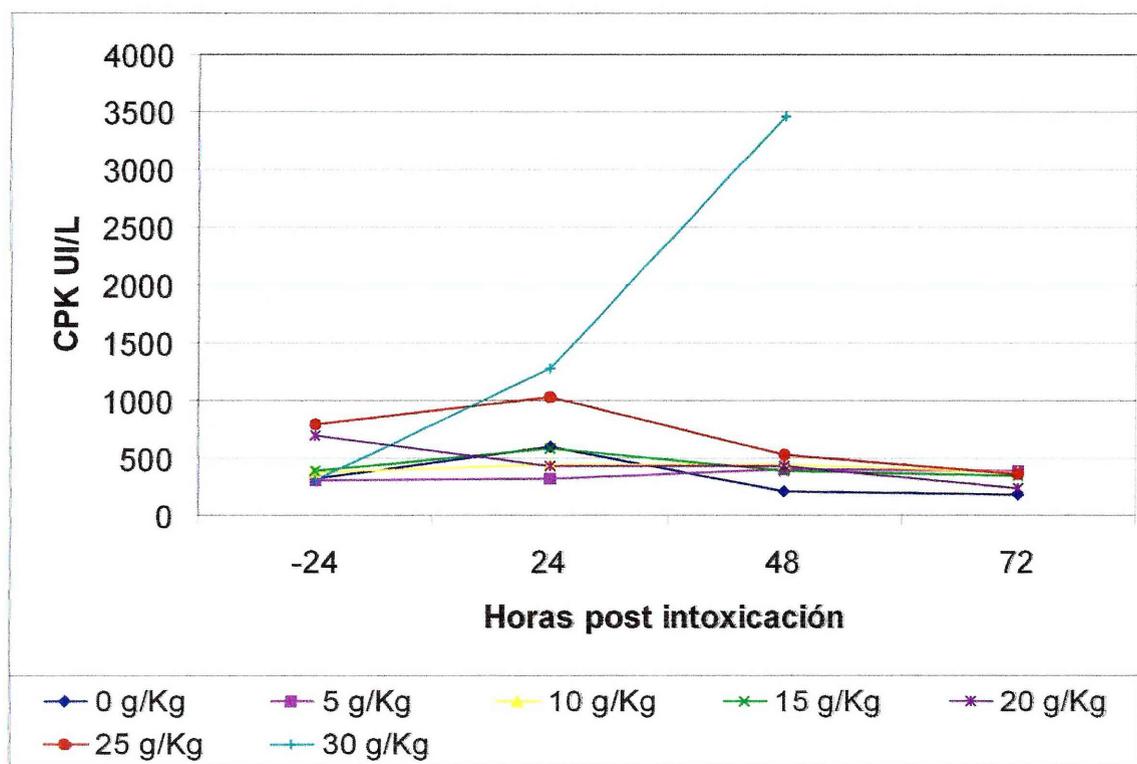


Fig. 6. Evolución de los valores séricos de la enzima creatinina fosfoquinasa (CPK) en bovinos intoxicados con hojas de *M. azedarach*.

Dosis (g/Kg)	AST	CPK
5	0,672	0,892
10	0,229	0,053
15	0,045	0,385
20	0,389	0,948
25	0,433	0,791
30	0,913	0,977

Tabla 11. Correlación entre las dosis de hojas de *M. azedarach* administradas a bovinos y los valores enzimáticos de AST y CPK. Los números indican el valor de *r*.

H.1.2. Lesiones en los bovinos

H.1.2.1. Hallazgos macroscópicos

La necropsia de los bovinos muertos por la intoxicación con frutos de *M. azedarach* demostró una congestión intestinal, principalmente, del intestino delgado, hígado amarillento o con áreas más claras y congestión cerebral. En el rumen, retículo e intestinos el contenido era líquido. La pared de la vesícula biliar del bovino N° 9 (30 g/kg) estaba edematosa. El animal sacrificado (20 g/kg de frutos) sólo mostró una congestión extensa del intestino.

Las lesiones macroscópicas observadas en los bovinos muertos por la intoxicación con hojas de *M. azedarach* se caracterizaron por la presencia de un hígado amarillento, congestión intestinal. El recto contenía heces sanguinolentas. Por su parte, los animales sacrificados 72 horas posteriores a la ingestión de hojas sólo mostraron una leve congestión intestinal.

En los bovinos muertos por la intoxicación con hojas de *M. azedarach* también se observaron congestión cerebral y petequias en el pericardio.

Los bovinos controles sacrificados en ambos grupos no mostraron lesiones.

H.1.2.2. Hallazgos microscópicos

Las alteraciones histológicas de los bovinos fueron similares, tanto en los intoxicados con frutos como en los que recibieron hojas de *M. azedarach*. En el hígado se observó congestión generalizada, edema en el espacio de Disse y tumefacción de los hepatocitos con moderada vacuolización del citoplasma o necrosis de los mismos con una distribución difusa en el parénquima hepático o localizados próximos a la vena centrolobulillar (Fig. 7). En los bovinos que recibieron dosis de 30 g/kg de frutos (N° 9 y 10) se observó, además, la presencia de numerosas vacuolas grandes en el citoplasma de los hepatocitos; los núcleos estaban aumentados de tamaño con la cromatina desplazada hacia la periferia; otros hepatocitos presentaban necrosis caracterizada por cariorrexis y cromatólisis. En el bovino N° 7 (25 g/kg de frutos) se observó, además, retención biliar leve, caracterizadas por la presencia de pigmento ictérico dentro de los canalículos biliares de algunas áreas hepáticas.

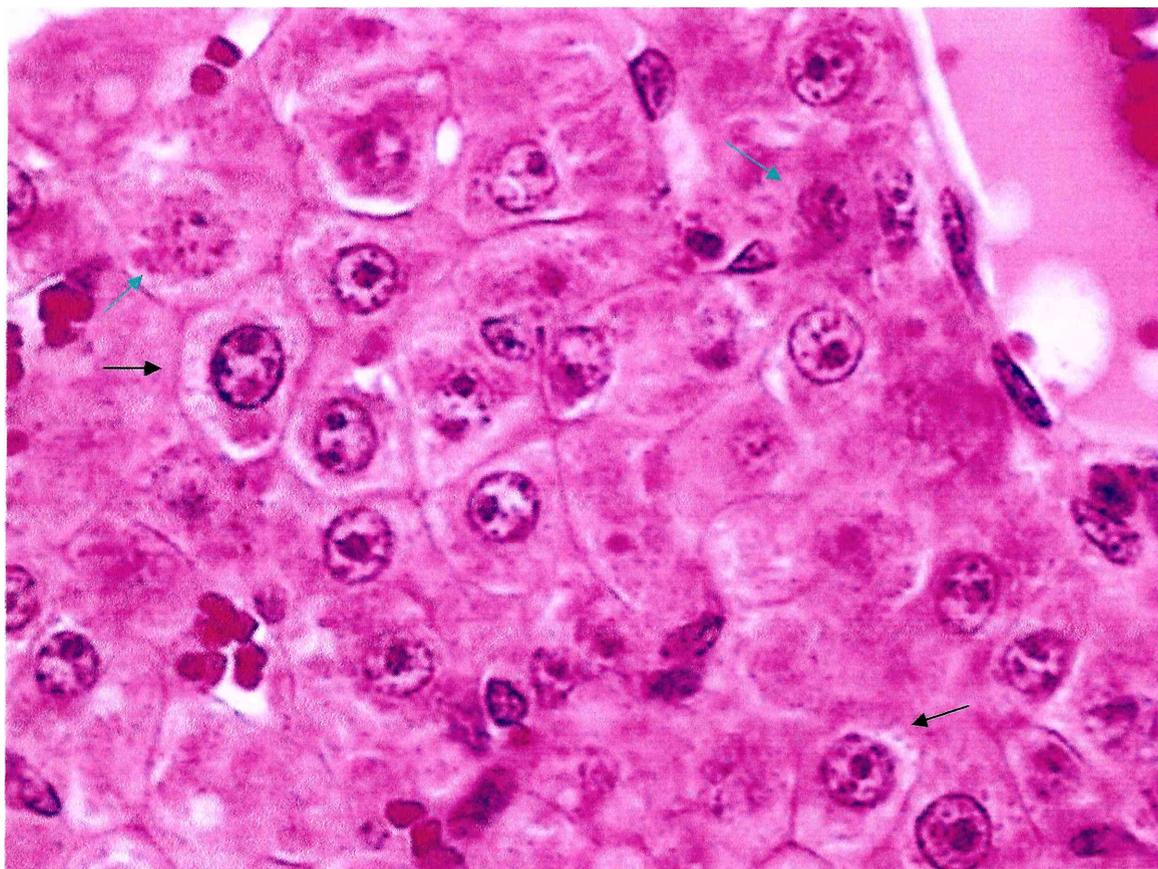


Fig. 7. Tumefacción celular (flechas negras) y necrosis (flechas celestes) de hepatocitos próximos a la vena centrolobulillar, en el bovino N° 7, intoxicado con 25 g/kg de frutos de *M. azedarach*. HE. 1000x.

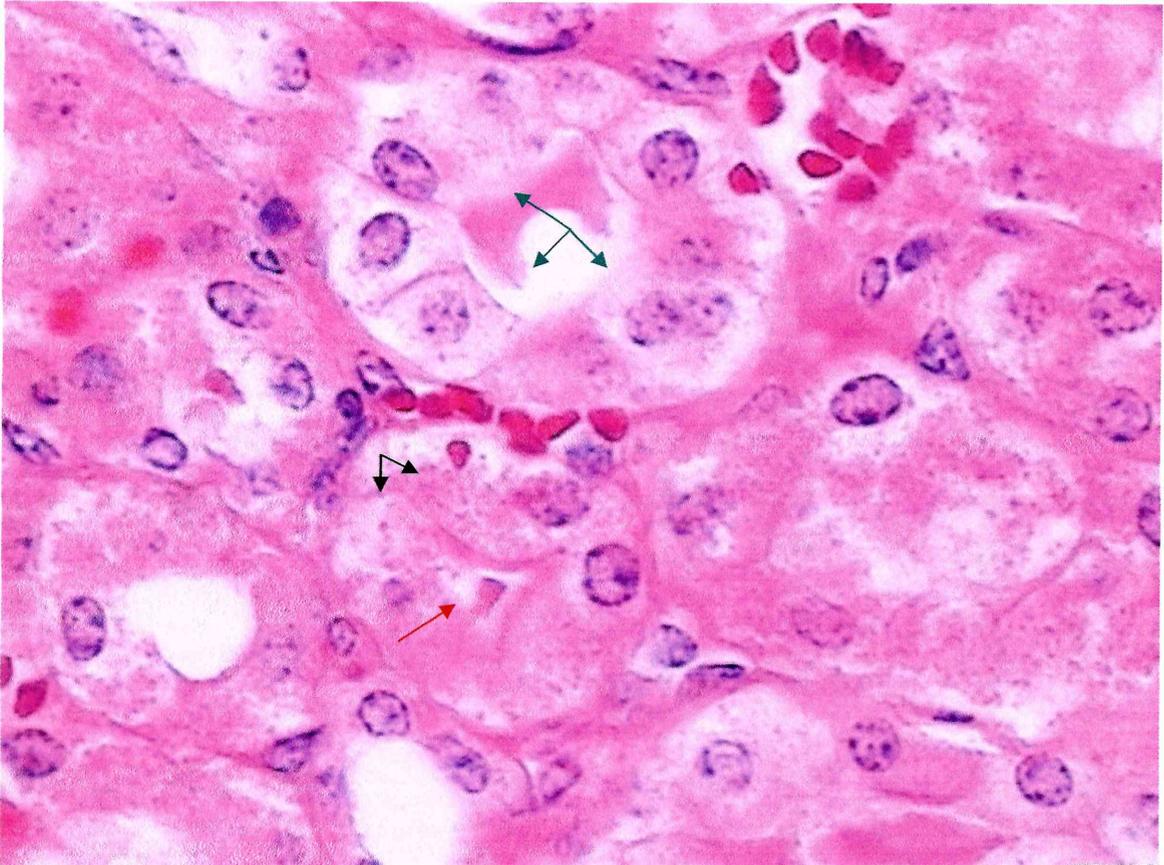


Fig. 8. Tumefacción celular (flechas negras) y vacuolización (flechas verdes) del epitelio tubular renal, en el bovino N° 7, intoxicado con 25 g/kg de frutos de *M. azedarach*. Se observa, además, congestión vascular y presencia de material hialino dentro de la luz de los túbulos contorneados proximales (flecha roja). HE. 1000x.

Las lesiones renales se caracterizaron por congestión, tumefacción y vacuolización de las células epiteliales de los túbulos. Estos signos se observaron exclusivamente en aquellos animales que murieron por la intoxicación. Ocasionalmente se observaron cilindros hialinos en los túbulos contorneados proximales. La mucosa intestinal estaba congestiva presentando un infiltrado de eosinófilos. Las alteraciones inflamatorias eran marcadas en el intestino grueso, observándose congestión e infiltración de células inflamatorias, principalmente neutrófilos, plasmocitos y eosinófilos. En algunos casos se observó necrosis superficial de las vellosidades intestinales.

En los linfonodos mesentéricos y principalmente en los folículos linfoides y placas de Peyer de los animales que murieron por la intoxicación, se observaron linfocitos apoptóticos y macrófagos conteniendo restos celulares (Fig. 9).

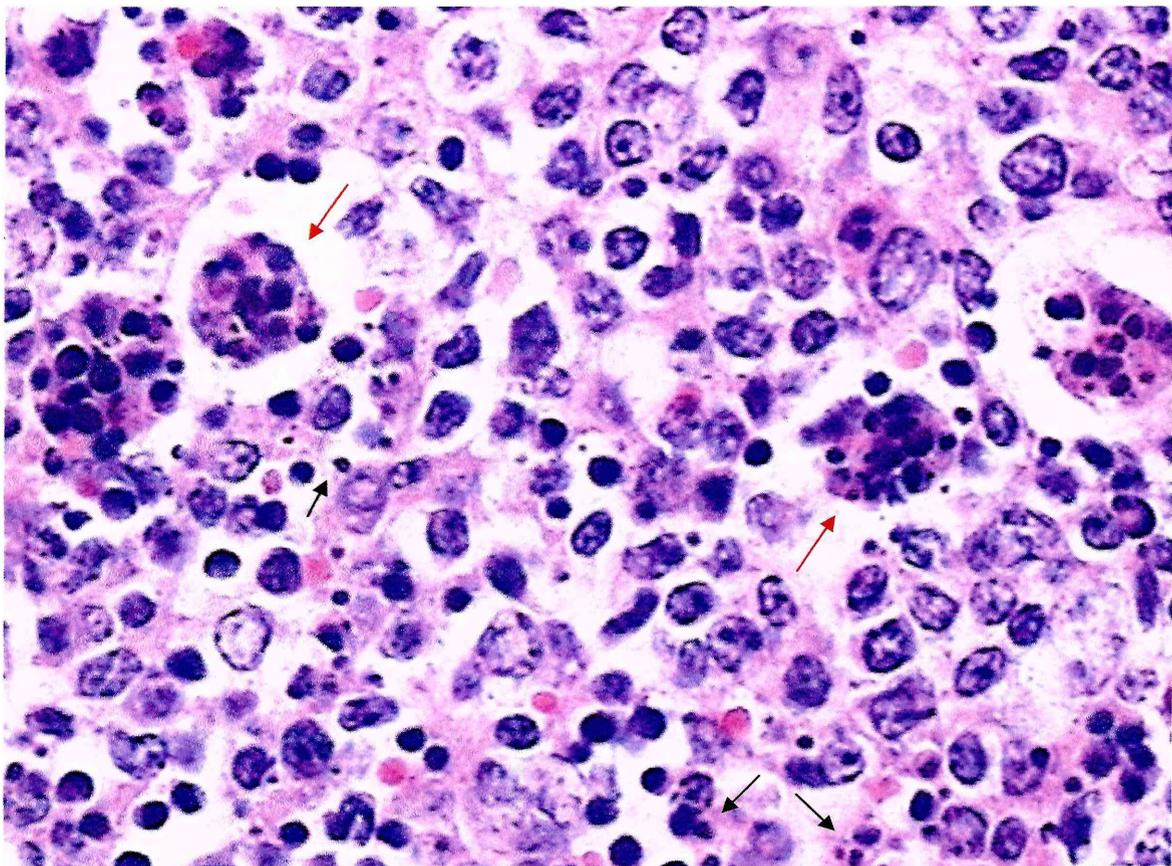


Fig. 9. Linfonodo mesentérico del bovino N° 9, intoxicado con 30 g/kg de frutos de *M. azedarach*. Se observa apoptosis celular (flechas negras) y la presencia de macrófagos conteniendo restos celulares (flechas rojas). HE. 1000x.

En los pulmones se observó congestión y edema. Esas lesiones eran similares en todos los bovinos.

En los bovinos que recibieron dosis de 30 g/kg de frutos y en aquellos que murieron intoxicados con las hojas, la pulpa blanca del bazo presentaba una severa congestión y necrosis.

Las alteraciones histológicas observadas en el rumen, retículo y omaso, fueron similares en los bovinos intoxicados con más de 25 g/kg de frutos y con 30 g/kg de hojas de *M. azedarach*. El epitelio del rumen presentaba microvesículas generalmente llenas de neutrófilos (Fig. 10). Se observaron lesiones similares en el retículo y en el omaso; no obstante, en este último eran más discretas. En el resto de los animales intoxicados no se observó ningún tipo de lesión.

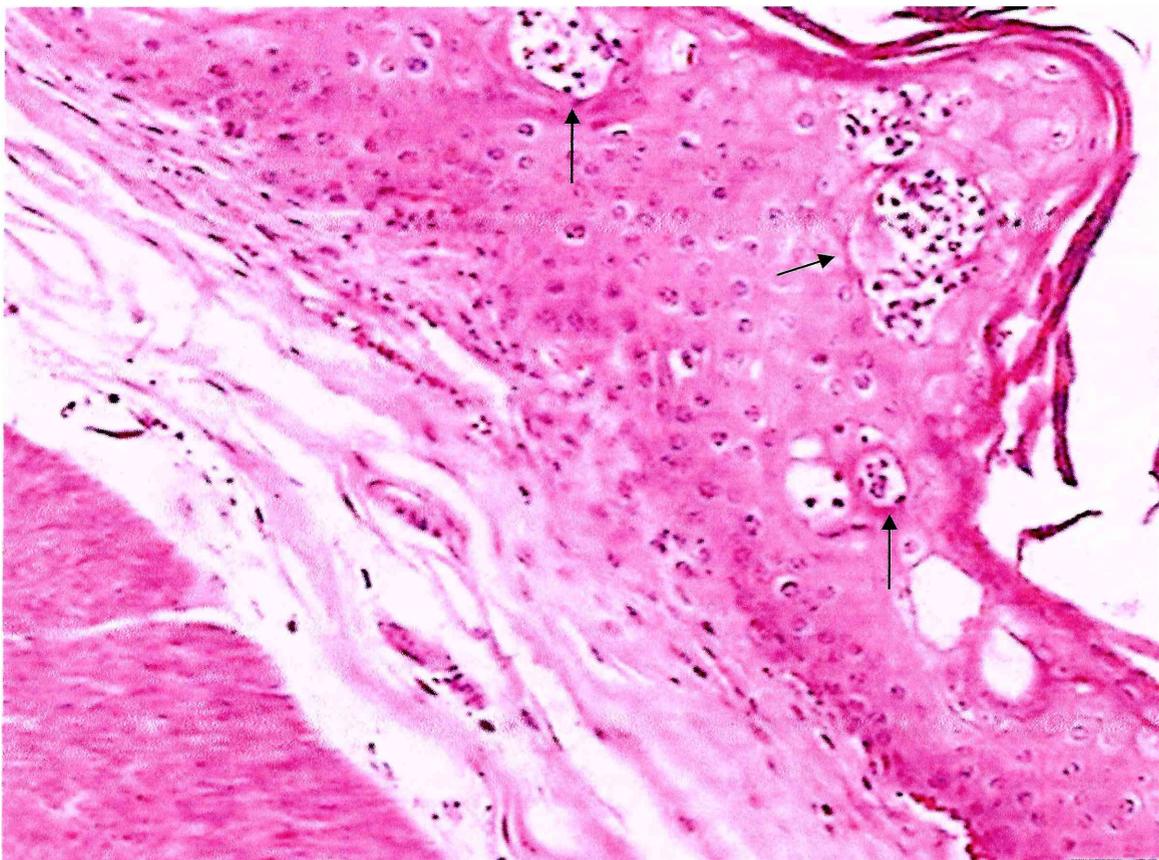


Fig. 10. Vista del epitelio ruminal del bovino N° 8, intoxicado con 25 g/kg de frutos de *M. azedarach*. Se observan microvesículas conteniendo neutrófilos (flechas). HE. 100x.

Las lesiones en los músculos esqueléticos fueron similares en los bovinos intoxicados con frutos y con hojas de *M. azedarach*. Las lesiones de los músculos esqueléticos se caracterizaron por degeneración y necrosis segmentaria de las fibras musculares y, ocasionalmente, hialinización (Fig. 11). En los fragmentos necróticos se observó material flocular o granular, pérdida del núcleo y restos nucleares localizados en las márgenes de la fibra muscular. Las células satélites estaban aumentadas de tamaño y presentaban un aspecto vesicular. En algunos fragmentos necróticos había invasión de macrófagos y células satélites con desaparición del sarcolema.

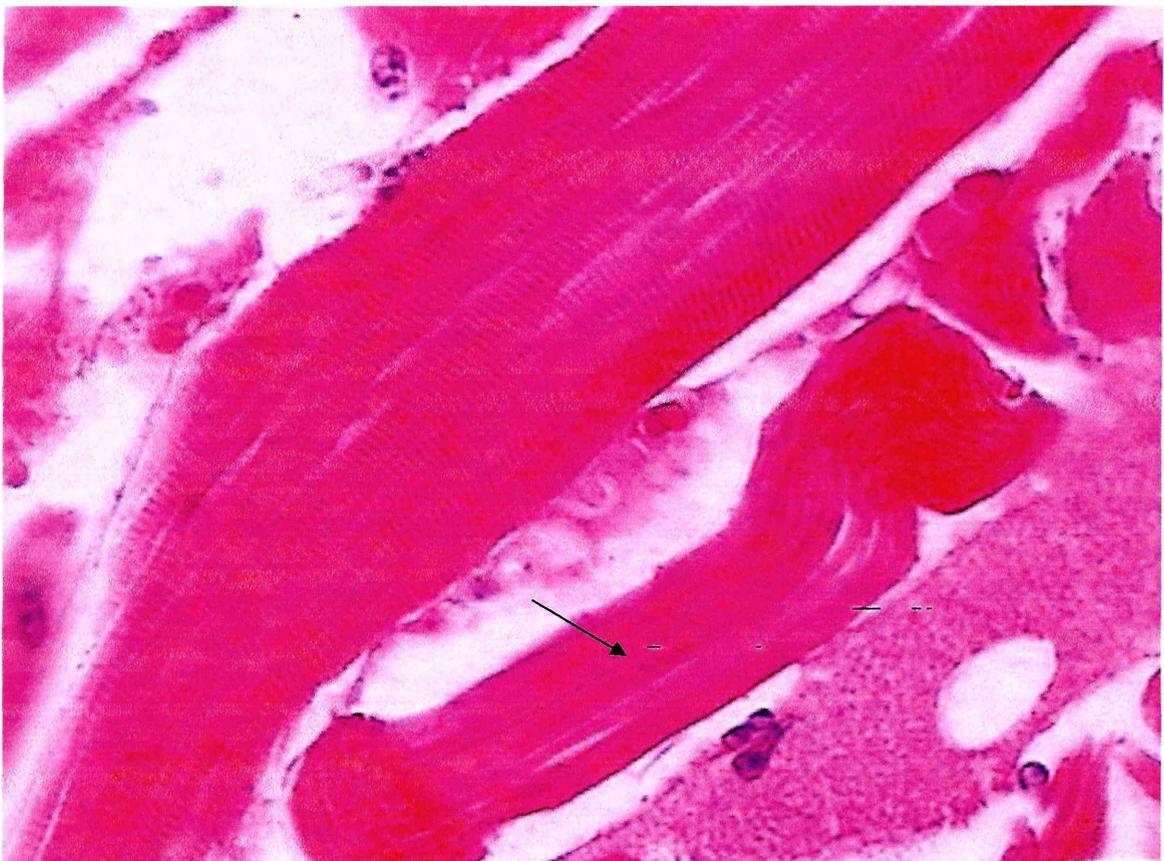


Fig. 11. Degeneración y necrosis segmentaria con hialinización de fibras del músculo largo dorsal (flecha), perteneciente al bovino N° 10, intoxicado con 30 g/kg de frutos de *M. azedarach*.

En su ultraestructura, los músculos esqueléticos presentaban algunas mitocondrias dilatadas con cavidades matriciales electrolúcidas debido a la presencia de líquido y distorsiones de

las crestas (Fig. 12). En otras mitocondrias se observaron esférulas electrodensas en la matriz mitocondrial. Se conservó la disposición de las miofibrillas, retículo sarcoplásmico y túbulos T. Ultraestructuralmente, los linfonodos presentaban cuerpos apoptóticos correspondientes a linfocitos y la presencia de macrófagos conteniendo restos celulares.



Fig. 12. Microscopía electrónica de una mitocondria dilatada con matriz electrolúcida y distorsión de las crestas (flecha). En la parte superior, se observa una mitocondria de tamaño normal con grandes esférulas electrodensas en la matriz (punta de flecha). Músculo esquelético del bovino N° 10. Barra= 0,5 μm .

No se observaron lesiones en los bovinos controles sacrificados de ambos grupos experimentales.

H.2. EXPERIMENTOS CON OVINOS

H.2.1. Datos clínicos

H.2.1.1. Intoxicación experimental con frutos de *M. azedarach*

Los signos clínicos observados en los ovinos de este experimento consistieron en apatía, anorexia, atonía ruminal y diarrea. Las heces eran pastosas en los ovinos que ingirieron dosis de 20 g/kg y líquidas en los animales que consumieron dosis de 25, 30 o 35 g/kg. En el ovino N° 10 (35 g/kg de frutos) la diarrea fue severa y el animal murió 48 horas después del consumo de los frutos. El tiempo transcurrido entre la ingestión de los frutos y el inicio de los signos clínicos, la duración de los mismos y la evolución de la enfermedad son presentados en la Tabla 12.

Ovino (N°)	Dosis de frutos (g/Kg)	Signos clínicos		Evolución
		Inicio	Duración	
1	15	24h	48h	Sobrevivió
2	15	-	-	Sobrevivió
3	20	24h	216h	Sacrificado
4	20	24h	48h	Sobrevivió
5	25	24h	72h	Sobrevivió
6	25	24h	72h	Sacrificado
7	30	24h	72h	Sacrificado
8	30	24h	24h	Sobrevivió
9	35	24h	24h	Sobrevivió
10	35	24h	24h	Murió
11 (control)	-----	-----	-----	Sobrevivió
12 (control)	-----	-----	-----	Sacrificado

Tabla 12. Evolución de la intoxicación experimental de ovinos con frutos de *M. azedarach*.

Los signos clínicos observados en los ovinos que recibieron frutos de *M. azedarach* se consignan en la Tabla 13.

N°	Dosis g/Kg	Signos clínicos			
		Apatía	Anorexia	Atonía ruminal	Diarrea
1	15	-	-	+	+
2	15	-	-	-	-
3	20	+	-	+	+
4	20	+	+	+	+
5	25	+	+	+	+
6	25	+	+	+	+
7	30	+	+	+	+
8	30	+	-	-	-
9	35	+	-	+	+
10	35	-	+	+	-
11	---	-	-	-	-
12	---	-	-	-	-

Tabla 13. Signos clínicos observados en los ovinos después de consumir frutos de *M. azedarach*. Los signos positivos [+] indican la presencia del signo clínico; los signos negativos [-] indican su ausencia.

Los valores séricos de las enzimas AST y CPK se presentan en las figuras 13 y 14, respectivamente. Con respecto a los niveles de AST no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, si bien se encontraron aumentos notorios a las 24, 48 y 72 horas en aquellos animales que recibieron 30 g/kg. Los valores de CPK séricos arrojaron diferencias significativas a las 48 y 72 horas en los animales intoxicados con 30 g/kg.

Se observó una correlación para los valores correspondiente a las dosis tóxicas elevadas (25, 30 y 35 g/kg) y los niveles enzimáticos de AST detectados. Esta correlación no se observó con las dosis bajas (15 y 20 g/kg) (Tabla 14). Por su parte, sólo se observó una correlación entre la dosis de 15 y 30 g/kg administrados en ovinos y los valores enzimáticos de la CPK.

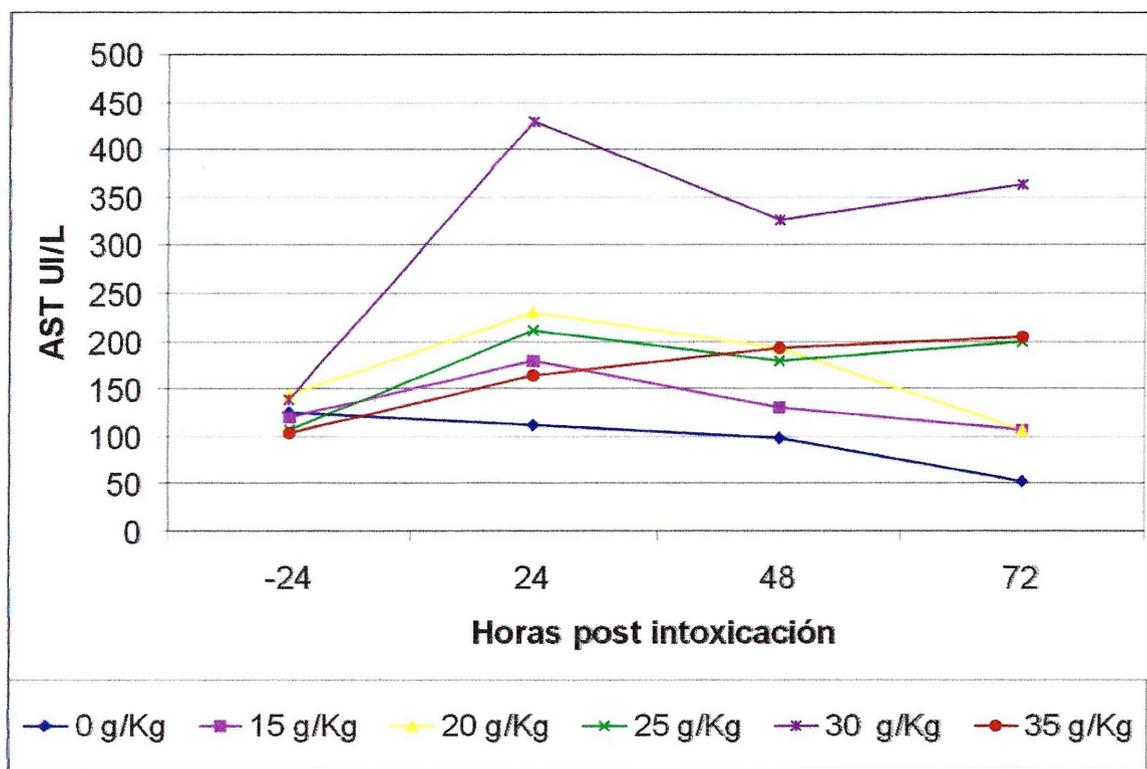


Fig. 13. Evolución de los valores séricos de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en ovinos intoxicados con frutos de *M. azedarach*.

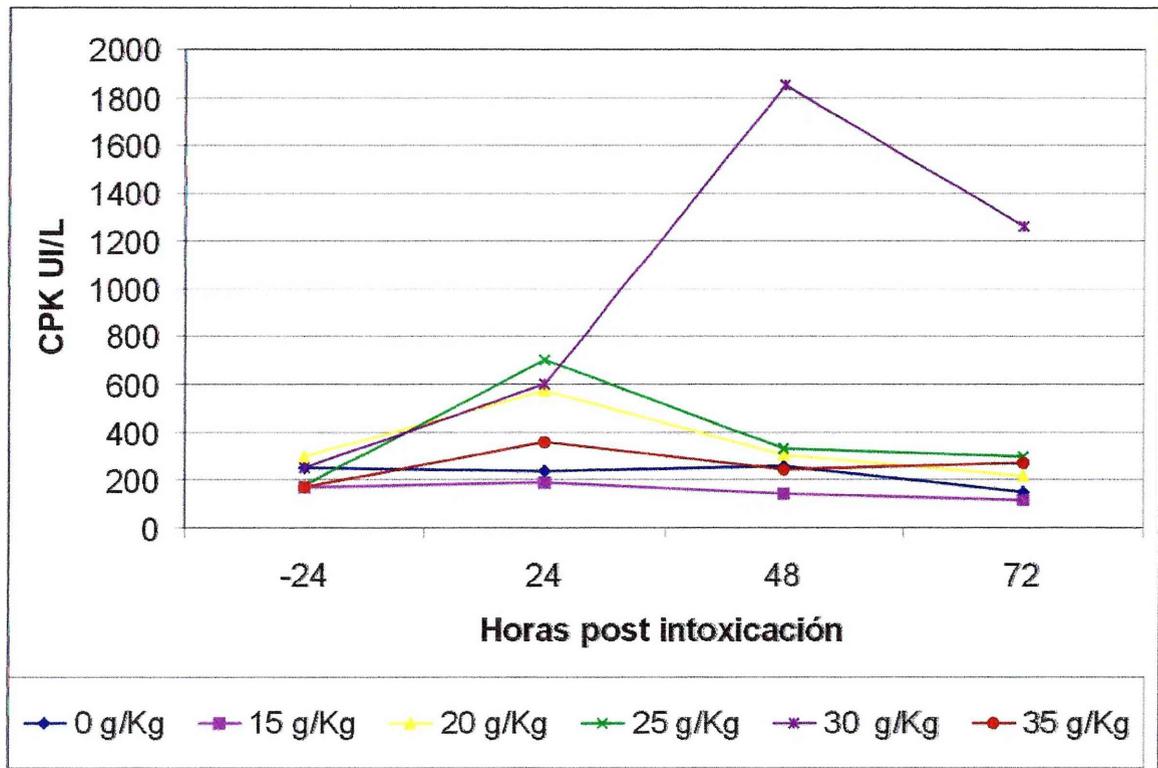


Fig. 14. Evolución de los valores séricos de la enzima creatinina fosfoquinasa (CPK) en ovinos intoxicados con frutos de *M. azedarach*.

Dosis (g/Kg)	AST	CPK
15	0,366	0,855
20	0,352	0,424
25	0,672	0,004
30	0,593	0,778
35	0,949	0,328

Tabla 14. Correlación entre las dosis de frutos de *M. azedarach* administradas a ovinos y los valores enzimáticos de AST y CPK. Los números indican el valor de r .

H.2.1.2. Intoxicación experimental con hojas de M. azedarach

En la Tabla 15 se observan el tiempo transcurrido entre la ingestión de las hojas y el inicio de los signos clínicos, la duración de los mismos y la evolución de la enfermedad para cada una de las dosis de hojas administradas.

Ovino (Nº)	Dosis de hojas (g/Kg)	Signos Clínicos		Evolución
		Inicio	Duración	
1	15	-	-	Sobrevivió
2	15	-	-	Sobrevivió
3	20	24h	48h	Sacrificado
4	20	-	-	Sobrevivió
5	25	96h	24h	Sacrificado
6	25	96h	24h	Sobrevivió
7	30	24h	48h	Sacrificado
8	30	-	-	Sobrevivió
9 (control)	-----	-----	-----	Sobrevivió
10 (control)	-----	-----	-----	Sacrificado

Tabla 15. Evolución de la intoxicación experimental de ovinos con hojas de *M. azedarach*.

Apatía, atonía ruminal y diarrea fueron los signos clínicos observados en los ovinos N° 3 (20 g/kg), 5 (25 g/kg), 6 (25 g/kg) y 7 (30 g/kg), como puede ser observado en la Tabla 16. Por su parte, no se observaron alteraciones clínicas en los animales controles (Tabla 16).

N°	Dosis g/Kg	Signos Clínicos		
		Apatía	Atonía ruminal	Diarrea
1	15	-	-	-
2	15	-	-	-
3	20	+	+	+
4	20	-	-	-
5	25	-	-	+
6	25	-	-	+
7	30	+	+	+
8	30	-	-	-
9	---	-	-	-
10	---	-	-	-

Tabla 16. Signos clínicos observados en los ovinos después de consumir hojas de *M. azedarach*

Los signos positivos [+] indican la presencia del signo clínico; los signos negativos [-] indican su ausencia.

Los valores séricos de las enzimas AST y CPK se presentan en las figuras 15 y 16, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de AST entre grupos. La CPK mostró un pico significativo a las 72 horas en los ovinos dosificados con 30 g/kg.

Se observó una correlación entre las dosis bajas administradas (15 y 20 g/kg) y los niveles enzimáticos de la AST. Asimismo, se detectó una tendencia de correlación en los animales que recibieron una dosis de 30 g/kg y los niveles enzimáticos detectados (Tabla 17).

Resultados similares se observaron para la enzima CPK, con la excepción de que la dosis de 15 g/kg fue la que no mostró correlación.

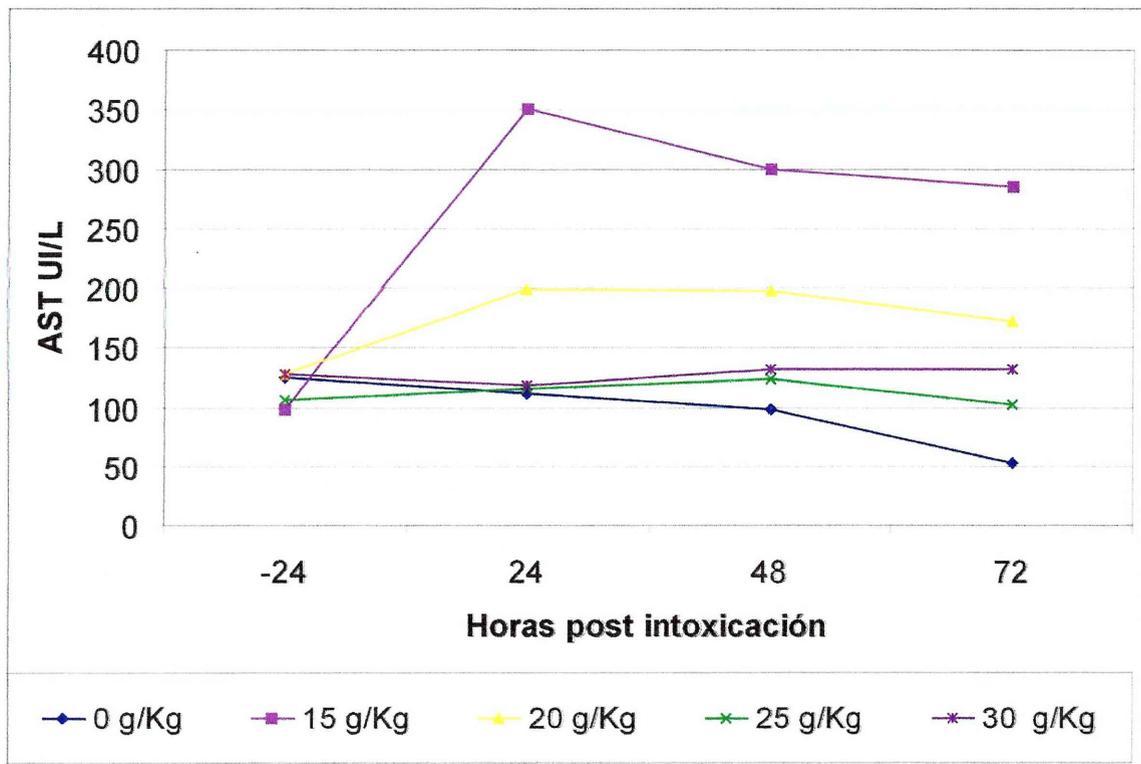


Fig. 15. Evolución de los valores séricos de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en ovinos intoxicados con hojas de *M. azedarach*.

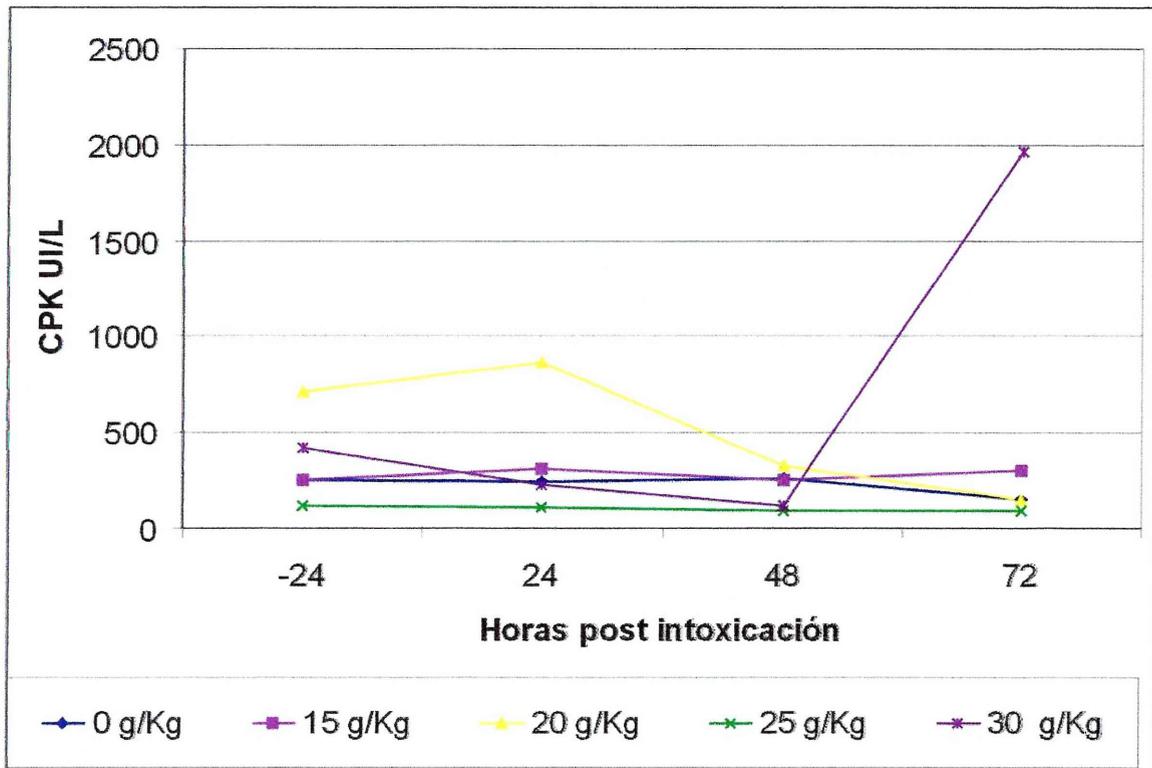


Fig. 16. Evolución de los valores séricos de la enzima creatinina fosfoquinasa (CPK) en ovinos intoxicados con hojas de *M. azedarach*.

Dosis (g/Kg)	AST	CPK
15	0,592	0,361
20	0,504	0,865
25	0,021	0,957
30	0,472	0,676

Tabla 17. Correlación entre las dosis de hojas de *M. azedarach* administradas a ovinos y los valores enzimáticos de AST y CPK. Los números indican el valor de *r*.

H.2.2. Lesiones en los ovinos

H.2.2.1. Hallazgos macroscópicos

En la necropsia del ovino N° 10, intoxicado con 35 g/kg de frutos, se observó que el hígado estaba amarillento con los lobulillos más marcados que en el hígado del animal control sacrificado. No se observaron lesiones significativas en la necropsia de los ovinos N° 3, N° 6 y N° 7 (20, 25 y 30 g/kg, respectivamente), que recibieron frutos, ni en los animales N° 3, N° 5 y N° 7 (20, 25 y 30 g/kg, respectivamente) que consumieron hojas.

Los animales controles sacrificados de ambos grupos experimentales no mostraron alteraciones macroscópicas.

H.2.2.2. Hallazgos microscópicos

Las lesiones histológicas observadas en el hígado del ovino N°3 (20 g/kg de frutos) se caracterizaron por degeneración y necrosis centrolobulillar. Se observó vacuolización de los hepatocitos, con presencia de grandes vacuolas en el citoplasma. Las células de Kupffer estaban cargadas de pigmento amarillento. En el hígado del ovino N° 10 (35 g/kg de frutos) se observaron hepatocitos tumefactos con vacuolización del citoplasma, núcleos aumentados de tamaño con la cromatina en la periferia y hepatocitos necróticos distribuidos de forma difusa en el parénquima. En los otros ovinos sólo se observó congestión hepática leve.

En todos los animales estudiados se observó congestión, tumefacción y vacuolización de las células epiteliales de los túbulos renales. En el ovino N° 10 (35 g/kg de frutos), también se observaron cilindros hialinos en los túbulos contorneados proximales. El edema y la congestión pulmonar sólo fueron observados en el animal que murió por la intoxicación.

En el ovino N° 10 (35 g/kg de frutos) también se observó una congestión severa del bazo y necrosis de linfocitos en los linfonódulos de los linfonodos. Ultraestructuralmente, en los linfonodos se observaron lesiones que se correspondían con los hallazgos histológicos.

No se observaron alteraciones en el rumen, omaso, abomaso, intestino delgado e intestino grueso.

En los músculos esqueléticos estudiados se observó degeneración y necrosis de fibras aisladas. En los fragmentos necróticos se observó material flocular o granular y, en algunos fragmentos necróticos, se produjo la invasión de macrófagos y células satélites con desaparición del sarcolema. En los estudios de microscopía electrónica se observaron mitocondrias dilatadas con cavidades matriciales electrolúcidas y distorsiones de las crestas. En algunas mitocondrias se observaron los mismos patrones observados en los músculos esqueléticos de los bovinos intoxicados.

No se observaron lesiones en los ovinos controles sacrificados de ambos grupos experimentales.

H.3. EXPERIMENTOS CON CERDOS

H.3.1. Datos clínicos

Dosis de 5 g/kg de frutos causaron diarrea discreta, aproximadamente 24 horas después de iniciado el consumo. Los cerdos se recuperaron rápidamente en las siguientes 24 horas. Signos clínicos caracterizados por incoordinación, temores musculares, decúbito esternal e hipotermia fueron observados en los cerdos que recibieron dosis de 10 y 20 g/kg y en un animal que recibió 15 g/kg de frutos (cerdo N° 6). La Tabla 18 presenta el tiempo transcurrido entre la ingestión de los frutos y el inicio de los signos clínicos, la duración de los mismos y la evolución de la enfermedad. Los cerdos controles no presentaron alteraciones clínicas (Tabla 19).

Los valores séricos de las enzimas AST y CPK se presentan en las figuras 17 y 18, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de AST entre grupos a excepción de los valores, registrados en los cerdos que recibieron una dosis de 10 g/kg, a las 48 y 72 horas, con respecto al resto de los animales. La CPK mostró un pico significativo a las 24 horas en los cerdos dosificados con 20 g/kg.

La enzima AST mostró una correlación para todas las dosis recibidas (a excepción de la de 5 g/kg) y los niveles enzimáticos detectados (Tabla 20). Todas las dosis de frutos recibidas por los cerdos, correlacionaron con los valores enzimáticos de la CPK.

Cerdo (Nº)	Dosis (g/Kg)	Signos clínicos		Evolución
		Inicio	Duración	
1	5	24h	24h	Sobrevivió
2	5	24h	24h	Sobrevivió
3	10	24h	24h	Sobrevivió
4	10	3h	24h	Sacrificado
5	15	5h	24h	Sobrevivió
6	15	24h	24h	Sobrevivió
7	20	2h	1h	Murió
8	20	2h	3h	Murió
9 (control)	-----	-----	-----	Sobrevivió
10 (control)	-----	-----	-----	Sacrificado

Tabla 18. Evolución de la intoxicación experimental de cerdos con frutos de *M. azedarach*.

Nº	Dosis g/Kg	Signos clínicos				
		Diarrea	Tremores musculares	Incoordinación	Hipotermia	Decúbito esternal
1	5	+	-	-	-	-
2	5	+	-	-	-	-
3	10	-	+	+	+	+
4	10	-	+	+	+	+
5	15	-	-	-	-	-
6	15	-	+	+	+	+
7	20	-	+	+	+	+
8	20	-	+	+	+	+
9	0	-	-	-	-	-
10	0	-	-	-	-	-

Tabla 19. Signos clínicos observados en los cerdos después de consumir frutos de *M. azedarach*. Los signos positivos [+] indican la presencia del signo clínico; los signos negativos [-] indican su ausencia.

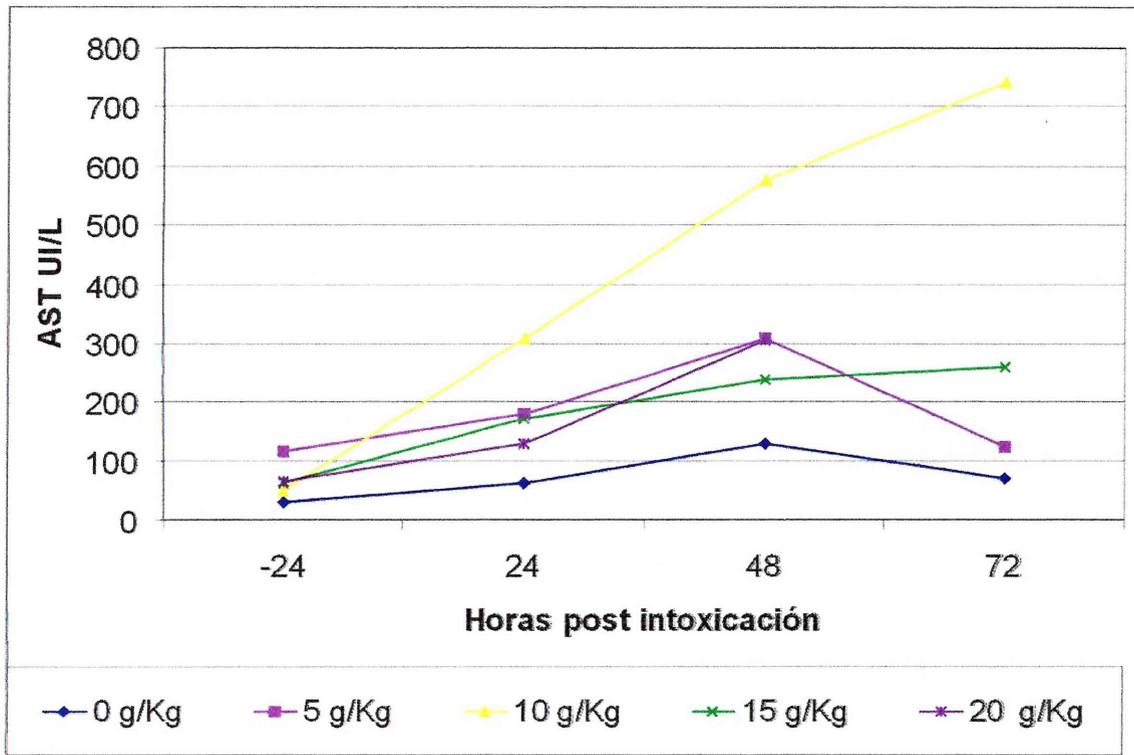


Fig. 17. Evolución de los valores séricos de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en cerdos intoxicados con frutos de *M. azedarach*.

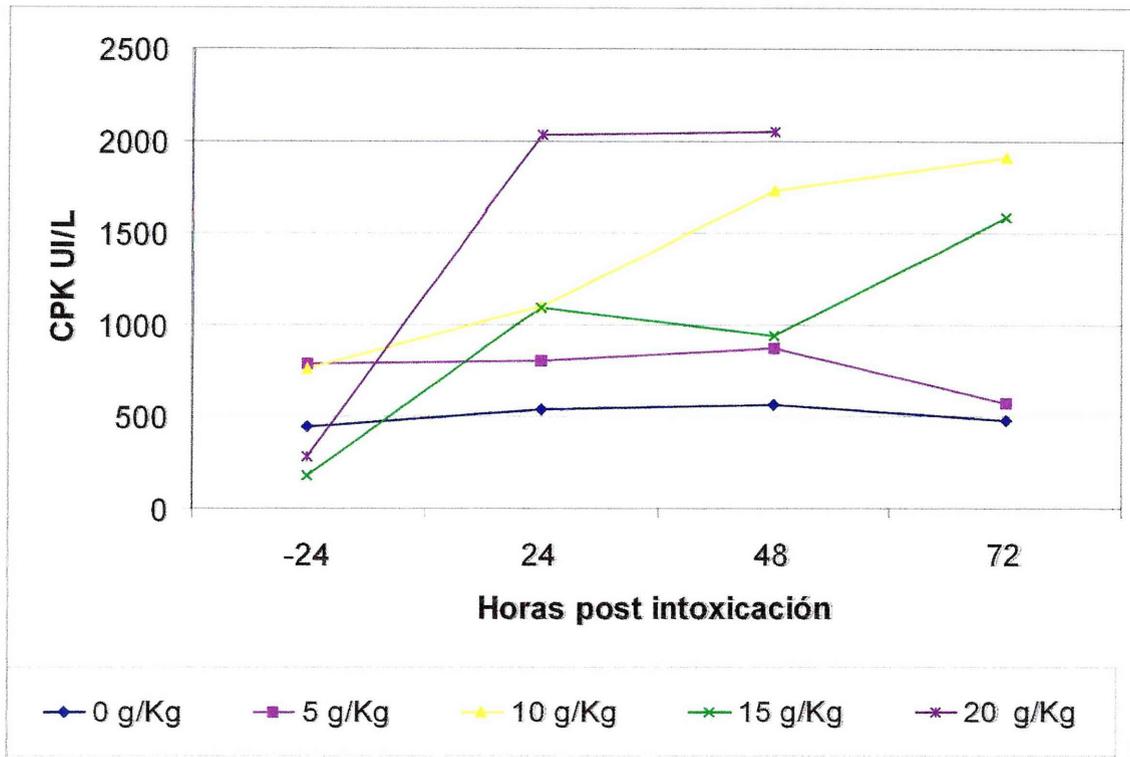


Fig. 18. Evolución de los valores séricos de la enzima creatinina fosfoquinasa (CPK) en cerdos intoxicados con frutos de *M. azedarach*.

Dosis g/Kg	AST	CPK
5	0,218	0,579
10	0,995	0,981
15	0,957	0,901
20	0,965	0,870

Tabla 20. Correlación entre las dosis de frutos de *M. azedarach* administradas a cerdos y los valores enzimáticos de AST y CPK. Los números indican el valor de *r*.

H.3.2. Lesiones en los cerdos

H.3.2.1. Hallazgos macroscópicos

Las alteraciones macroscópicas más destacadas, observadas en las necropsias, fueron la congestión de todo el intestino delgado y de la mucosa del estómago.

H.3.2.2. Hallazgos microscópicos

Las alteraciones histológicas consistieron en degeneración grasa en hígado y riñón, congestión y edema pulmonar, severa congestión del bazo, congestión y necrosis de la mucosa gástrica y del intestino delgado, discreta a moderada necrosis de linfocitos en linfonodos y tejido linfático del intestino.

En los músculos esqueléticos estudiados se observó degeneración hialina, fragmentación y necrosis de fibras. En las fibras necróticas se observó material de aspecto granular, ausencia de núcleos y restos nucleares en las márgenes de la fibra. Frecuentemente, esos fragmentos necróticos presentaban infiltración de macrófagos y células satélites. Estas últimas tenían un aspecto vesicular.

El animal control sacrificado no mostró lesiones macro ni microscópicas.

Las alteraciones ultraestructurales observadas en los músculos esqueléticos del cerdo N° 8 (20 g/kg) consistieron en la presencia de mitocondrias dilatadas con cavidades matriciales electrolúcidas y distorsiones de las crestas. Otras mitocondrias presentaron esférulas electrodensas en la matriz mitocondrial. Las alteraciones ultraestructurales fueron similares a las observadas en bovinos y ovinos. Se conservó la disposición de las miofibrillas, retículo sarcoplásmico y túbulos T.

En la ultraestructura de los linfonodos se observaron lesiones que se correspondían con los hallazgos histológicos.

I. DISCUSIÓN

Melia azedarach es un árbol ornamental de crecimiento rápido y distribución mundial (18). Experimentalmente, ha sido demostrado que los frutos son tóxicos para cerdos y, en menor grado, para las aves domésticas, ovinos y caprinos (15). La intoxicación afecta, principalmente, a los cerdos (9, 15, 18, 23). Los bovinos, ovinos, caprinos, aves domésticas y caninos también pueden verse afectados (9, 12, 22), pero los casos de intoxicación natural son raros (9). Los bovinos pueden intoxicarse por la ingestión de hojas del árbol, mientras que los ovinos se intoxican luego de ingerir frutos de paraíso (9). No obstante, hasta el momento no se había determinado la dosis tóxica de los frutos y hojas del paraíso, así como tampoco las lesiones que éste induce en bovinos y ovinos.

Los frutos son más tóxicos que las hojas y los frutos maduros son más tóxicos que los verdes (9, 10, 15, 18). Los resultados de nuestros experimentos en bovinos sugieren que la toxicidad de hojas y frutos es similar para esta especie. Dosis únicas de 25 y 30 g/kg de frutos fueron letales. Las hojas fueron letales en dosis únicas de 30 g/kg.

Algunos autores consideran que los ovinos son muy resistentes a los frutos maduros (9), mientras que para otros, los ovinos y los cerdos son los animales más sensibles a la intoxicación (18). Los resultados de este trabajo parecen indicar que los ovinos son menos sensibles a la intoxicación cuando son comparados con los bovinos y cerdos. Para Kingsbury (18) la dosis tóxica de frutos para cerdos y ovinos es de aproximadamente 5 g/kg. No obstante, en nuestro estudio, dosis de 30 g/kg de frutos de *M. azedarach* no fueron letales para los ovinos.

De acuerdo con diversos autores los signos clínicos se manifiestan rápidamente, pocas horas después de la ingestión y se relacionan con el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso (9, 12, 18, 23). En nuestro estudio, los signos clínicos en bovinos se manifestaron dentro de las primeras 24 horas de intoxicación, produciéndose su muerte hasta las 48 horas posteriores. Estos datos coinciden con los observados por Hare (12), quien menciona que los animales intoxicados no sobreviven, generalmente, más de 48 horas después de presentar los signos clínicos.

Los signos clínicos de los animales naturalmente intoxicados con *M. azedarach* (12, 13, 18, 19) son similares a los observados en los animales intoxicados experimentalmente en este estudio. En ambos casos se observa apatía, atonía ruminal, ataxia, temores musculares, dificultad para mantenerse en pie e hipotermia. Estos signos fueron observados tanto debido a la ingestión de frutos como de hojas de paraíso.

En los ovinos que consumieron frutos de paraíso, los signos clínicos también se manifestaron dentro de las 24 horas posteriores a su ingestión. No obstante, a diferencia de lo observado con los bovinos, solo murió un animal que había ingerido muy altas dosis de frutos de paraíso.

Los cerdos son los animales más afectados y se intoxican cuando ingieren los frutos maduros que caen al suelo (9, 23). Los signos clínicos se manifiestan súbitamente, generalmente en 2 a 4 horas posteriores a la ingestión de los frutos, y la muerte sobreviene dentro de las 24 horas posteriores. Los animales menos afectados pueden morir en algunos días o mostrar una recuperación lenta (9, 18, 19, 23). En nuestro estudio, los cerdos que habían consumido una elevada dosis de frutos murieron hasta 3 horas posteriores a la intoxicación.

La diarrea fue uno de los signos clínicos más constantes de la intoxicación. Esta manifestación se observó en 3 de los cerdos que sobrevivieron, así como en la mayoría de los bovinos y ovinos intoxicados con frutos. Según Oelrichs et al. (22), la diarrea observada en los cerdos se produce, aparentemente, cuando los animales ingieren dosis no letales de frutos y se recuperan en 2 a 3 días. En nuestro trabajo observamos que dosis no letales (25 g/kg) de hojas de paraíso también causaron diarrea en los bovinos, los cuales se recuperaron en 3 a 4 días. Por otro lado, dosis de 30 g/kg de hojas fueron letales y los animales presentaron heces secas con sangre. Este mismo signo es característico en bovinos intoxicados experimentalmente con *Baccharis coridifolia* (*B. coridifolia*) (30). Si bien en esta última intoxicación también puede observarse diarrea, la misma se presenta, generalmente, en animales con un curso clínico prolongado (30).

En los cerdos y bovinos, intoxicados tanto con hojas como con frutos, se observaron signos clínicos que pueden ser interpretados como de origen nervioso. Estos signos no fueron observados en los ovinos. En cerdos, han sido descritos signos nerviosos caracterizados

por depresión, convulsiones, ataxia y paresia (12, 23). En los cerdos de nuestros experimentos, los signos clínicos se caracterizaron por incoordinación, temores musculares, principalmente en los miembros pelvianos, hipotermia y decúbito esternal. Esos signos son similares a los descritos por Kwatra et al. (19) quienes relatan una intoxicación en cerdos debido a la ingestión de frutos y hojas de *M. azedarach*. Oelrichs et al. (23) observaron contracciones musculares severas y rápidas, 2 a 4 horas después de la administración de meliatoxinas, sustancias extraídas de los frutos de *M. azedarach*. Los animales presentaron también hipotermia, muriendo en un período de 30 horas.

Algunos de los signos clínicos observados en los bovinos y cerdos intoxicados con *M. azedarach* pueden ser interpretados como de origen nervioso. No obstante, el estudio histológico del sistema nervioso central no reveló alteraciones que justificasen dichos signos. De cualquier forma, la falta de hallazgos microscópicos no excluiría la posibilidad de alteraciones ultraestructurales o bioquímicas. Por otro lado, algunos de esos signos clínicos podrían deberse a las lesiones musculares. En los bovinos intoxicados por *B. coridifolia* también se describen signos nerviosos. Según Varaschin et al. (34), en los casos de intoxicación por *B. coridifolia*, los signos clínicos pueden ser provocados por el dolor u otros efectos de la planta.

Las lesiones macroscópicas descritas como congestión hepática y renal (13) e hiperemia gastrointestinal en los casos agudos no son específicas (18, 23). Nuestros hallazgos fueron también inespecíficos. Se caracterizaron por congestión intestinal en los bovinos y cerdos, congestión de la mucosa del estómago en los cerdos e hígado amarillento o con áreas más claras en los bovinos y ovinos.

Algunos autores describen degeneración grasa e hiperemia del hígado y riñón, en animales intoxicados que sobreviven algunos días (9, 18, 23). En nuestros estudios, la degeneración y necrosis en órganos del sistema digestivo, necrosis del tejido linfático, necrosis de los músculos esqueléticos y moderadas alteraciones en el hígado y riñón fueron observadas en los bovinos intoxicados tanto con hojas como con frutos de *M. azedarach*. En los ovinos, las alteraciones del hígado y riñón y las lesiones en los músculos esqueléticos fueron similares a la de los bovinos. La necrosis del tejido linfático solamente fue observada en el bazo, en

un solo animal, y era discreta. No se observaron alteraciones en los órganos digestivos analizados en los ovinos.

En cerdos se describe la necrosis de la mucosa gástrica como la principal alteración. Otras lesiones incluyen cilindros hialinos en los túbulos renales y necrosis de linfocitos en los linfonodos y en el bazo (19, 23). Los resultados de este estudio muestran alteraciones degenerativas moderadas en hígado y riñón; necrosis discreta a moderada de linfocitos en tejido linfático y degeneración y necrosis de los músculos esqueléticos.

En Brasil, otras plantas tóxicas causan alteraciones digestivas similares a las producidas por *M. azedarach* y deben ser consideradas a la hora de establecer un diagnóstico diferencial. La intoxicación por *B. coridifolia* en bovinos (30, 34), *B. megapotamica* var. *megapotamica* y var. *weirii* en bovinos (32) y la intoxicación por *B. megapotamica* var. *weirii* en caprinos (4) presentan algunas lesiones similares a las observadas en la intoxicación por *M. azedarach* en bovinos.

Las alteraciones histológicas caracterizadas por necrosis del tejido linfático, degeneración y necrosis del epitelio del rumen y retículo observadas en las intoxicaciones por *B. coridifolia* (5, 34) y *B. megapotamica* (32) son semejantes a las alteraciones histológicas encontradas en los bovinos intoxicados con *M. azedarach*. La vacuolización del epitelio ruminal, descrita en la intoxicación con habas de *Stryphnodendron obovatum* (6), también fue observada en la intoxicación con *M. azedarach*. No obstante, esta característica se presenta normalmente en la porción superficial del epitelio ruminal (3). En la intoxicación por *B. coridifolia* las lesiones gastrointestinales son atribuidas al efecto cáustico directo de las micotoxinas, pero el mecanismo de acción no está claro (5). Esas micotoxinas, responsables de las lesiones causadas por *B. coridifolia*, son tricotecenos macrocíclicos y roridinas. Sustancias semejantes, los llamados bacarinoideos, son el principio tóxico de *B. megapotamica* (17).

En relación con la necrosis de linfonodos observada en la intoxicación por *B. coridifolia* (34) y *B. megapotamica* (32), se sugiere que las células afectadas son los linfocitos B (34). La acción de tricotecenos (principios tóxicos de esas plantas) sobre los linfocitos, ya fue documentada en el tratamiento de ratones con leucemia de tipo B (17). En las intoxicaciones

por *M. azedarach*, dada la distribución anatómica de las lesiones dentro de los linfonódulos, parecería ser que las poblaciones linfáticas afectadas también serían las de células B.

Tursch et al. (33) aislaron saponinas de las habas de *Stryphnodendron coriaceum*. Hasta el presente se desconoce el principio tóxico de las habas de esta planta; Brito et al. (6) sugieren que las saponinas pueden ser las responsables o, al menos, las sustancias que participan de la patogenia de la intoxicación. Según Kingsbury (18) las saponinas encontradas en algunas plantas pueden causar irritación del tracto digestivo.

Lesiones hepáticas y renales, semejantes a las descritas en la intoxicación por *Stryphnodendron coriaceum* en bovinos (31), fueron observadas en los bovinos intoxicados con *M. azedarach* en el presente trabajo.

La degeneración y necrosis de las fibras musculares de los músculos esqueléticos fueron observadas en los bovinos, ovinos y cerdos. Esas lesiones son similares a las descritas en ratas alimentados con hojas de *M. azedarach* (2). En los experimentos con bovinos las lesiones musculares fueron observadas en los animales intoxicados con hojas y con frutos. Estos resultados demuestran que la sustancia responsable de causar esas lesiones puede ser encontrada tanto en las hojas como en los frutos de *M. azedarach* y provocaría alteraciones similares a las observadas en los ratones. En la intoxicación de cerdos con frutos de paraíso se describen espasmos neuromusculares (22, 23). No obstante, no se describen lesiones en los músculos esqueléticos.

Las alteraciones observadas en las mitocondrias sugieren una interferencia en los mecanismos bioquímicos que mantienen la homeostasis de esas organelas. Las alteraciones consistían en el acúmulo de líquido exclusivamente en la matriz mitocondrial con el consecuente aumento de la electroluminosidad. La presencia de esférulas densas en la matriz podría representar granos matriciales aumentados de tamaño.

La mionecrosis quedó evidenciada, asimismo, por el aumento de los niveles séricos de las enzimas CPK y AST después de la ingestión de *M. azedarach*. Valores altos de CPK fueron observados en la mayoría de los animales que murieron. Este hecho demuestra que algún componente presente tanto en las hojas como en los frutos de *M. azedarach* es el responsable del daño en las fibras musculares, con consecuente elevación de la enzima en el suero sanguíneo.

La CPK es una enzima específica del tejido muscular, siendo liberada de las fibras musculares en degeneración, hacia la sangre. La determinación de los niveles de esta enzima es un indicativo de lesión muscular (16). El aumento de los niveles de CPK indica el daño del músculo esquelético. Esto puede ocurrir por efectos del ejercicio normal, traumas o enfermedades del músculo. Los niveles de CPK pueden ser muy elevados en los inicios de la distrofia muscular, pero pueden caer a valores normales cuando se pierde masa muscular. El aumento de los niveles de CPK también se observa en la miositis, la mioglobinuria, la toxoplasmosis y la triquinosis. El hipotiroidismo también puede causar un aumento de CPK (8).

La AST no tiene especificidad para órganos o tejidos, pero la determinación de esa enzima en el suero es una ayuda muy valiosa en el diagnóstico. Se encuentra en altas concentraciones en los músculos esqueléticos y cardíaco, pero su actividad puede ser también elevada en el hígado y otros órganos y tejidos (16). La AST se encuentra presente en el corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, páncreas, bazo, pulmón, eritrocitos y cerebro. Cuando se afectan estos tejidos, las células se destruyen y AST se libera en el torrente sanguíneo. La cantidad de AST se relaciona directamente al número de células afectado por la injuria, pero el nivel de elevación depende del tiempo que transcurre hasta el análisis de la muestra sanguínea. Los niveles séricos de la AST se elevan 8 horas después de la lesión celular, alcanza el máximo a las 24-36 horas y regresa a los valores normales en 3 a 7 días. Si la lesión celular es crónica, los niveles de AST permanecerán elevados (24).

Tasaka et al. (28) observaron una elevación de estas enzimas en la intoxicación con semillas de *Senna occidentalis* (*S. occidentalis*) en conejos. Los autores sugieren que las alteraciones en la AST pueden ser debidas a las lesiones en el músculo u otros tejidos y puede reflejar la degeneración vacuolar observada en el hígado y riñón. La elevación de los niveles de CPK y AST fue observada en las distrofias musculares hereditarias, deficiencia de Vitamina E y selenio, en la mioglobinuria de los equinos y en la miodegeneración debida a la ingestión de plantas tóxicas (16). Severas elevaciones séricas de las enzimas CPK y AST también se observan en la intoxicación con *S. occidentalis* en bovinos y equinos (9). En esa intoxicación se produce mioglobinuria como consecuencia de la lesión en la fibra muscular. En bovinos jóvenes, la intoxicación con *S. occidentalis* puede ocurrir sin mioglobinuria,

probablemente debido a que el músculo de esos animales contiene poca mioglobina (5). En la intoxicación por *M. azedarach* en bovinos, ovinos y cerdos no fue observada la mioglobinuria, como tampoco sucede en la intoxicación con *S. occidentalis* en equinos (9). Este hecho podría ser explicado, tal vez, debido a que el curso clínico es agudo en ambas intoxicaciones, con manifestaciones a las pocas horas de haber ingerido el tóxico.

El coeficiente de correlación es descriptivo. Mide la covariación existente entre las magnitudes de los elementos. En nuestro caso establecimos la correlación entre la dosis suministrada y los valores, medidos en UI/l de enzimas séricas. Los resultados encontrados no pueden ser considerados como estandarizados ya que, como fuera aclarado en el punto G.5. la cantidad de animales estudiados no fue la suficiente como para establecer un patrón concreto. No obstante, mediante estos resultados podemos establecer tendencias para futuros trabajos. En todos los casos, los valores de r considerados significativos indicarían que existió una relación directa entre la dosis administrada y el daño tisular producido. De haber podido estandarizar los datos para cada una de las dosis y cada uno de los días analizados, hubiésemos podido establecer un método de diagnóstico indirecto de intoxicación de los animales y valorar su evolución.

Diferentes sustancias han sido aisladas y caracterizadas como principios tóxicos de *M. azedarach*. Para algunos autores la toxina se encuentra en la pulpa del fruto y es un alcaloide de estructura química desconocida; otros aislaron saponinas con propiedades hemolizantes (10, 22) y varios limonoides potencialmente tóxicos (1, 14, 21). Los análisis químicos realizados por Carratala (7) revelaron la presencia de un alcaloide, la azaridina, una resina, tanino y ácidos meliotánico y benzoico. Oelrichs et al. (22) aislaron e identificaron tetranortriterpenos de la clase limonoide, denominadas meliatoxinas A1, A2, B1 y B2, como principios tóxicos de los frutos de *M. azedarach* (22, 23). Estos autores sugieren que las sustancias mencionadas serían responsables de los signos nerviosos agudos y muerte en cerdos y que otra sustancia, aún no identificada, sería la responsable de los signos digestivos. El mecanismo de acción de esas sustancias es aún desconocido. Solamente después de conocer su bioquímica podría elaborarse un antídoto.

J. CONCLUSIONES

El cuadro clínico y las lesiones observados en bovinos, ovinos y cerdos en el presente trabajo, demuestran la toxicidad de *M. azedarach* para esas especies. Se demuestra, además, que la ingestión de frutos u hojas en diversas dosis puede afectar a varios órganos y sistemas. Dada la variedad de signos clínicos y lesiones observadas, es probable que diversos principios tóxicos estén involucrados en la patogenia de la enfermedad.

En el presente trabajo se demostró que:

- * Todos los bovinos a los que se le administró frutos y hojas de *M. azedarach* manifestaron signos clínicos de la intoxicación.
- * Todos los bovinos intoxicados con frutos y hojas de *M. azedarach* presentaron apatía y atonía ruminal.
- * Dosis superiores a los 15 g/kg de frutos de *M. azedarach* indujeron la aparición de diarrea, temores musculares e incoordinación de los bovinos, mientras que se requirieron 25 g/kg de hojas de la planta para inducir los mismo signos clínicos.
- * Dosis de 25 y 30 g/kg de frutos de *M. azedarach* indujeron la aparición de signos de disnea, hipotermia y decúbito esternal en los bovinos. Estos mismos signos sólo se observaron en bovinos intoxicados con 30 g/kg de hojas de *M. azedarach*
- * Dosis de 25 y 30 g/kg de frutos de *M. azedarach* fueron letales para los bovinos, entre 20 y 48 horas posteriores al comienzo de los signos clínicos. Las hojas del paraíso produjeron la muerte de los bovinos que consumieron 30 g/kg de hojas de *M. azedarach*, entre 2 y 36 horas posteriores al inicio de los signos clínicos.
- * Los signos clínicos de los animales muertos por la intoxicación con frutos comenzaron entre las 4 y 8 horas posteriores a su administración, mientras que en aquellos animales que recibieron hojas, comenzaron a las 12 horas.
- * Los signos clínicos fueron observados sólo en los ovinos que consumieron 20 o más g/kg de frutos de *M. azedarach*, algunos signos fueron observados con dosis de 15 g/kg.

- * Con una dosis de 35 g/kg de frutos, solo se registró la muerte de un ovino, que sobrevino a las 24 horas posteriores al comienzo de los signos clínicos de la intoxicación.
- * Prácticamente, la ingestión de hojas de *M. azedarach* no produjo signos clínicos en los ovinos. Este hecho se correlaciona con la ausencia de muertes inducidas por la ingestión de hojas.
- * Todos los cerdos intoxicados con frutos de *M. azedarach* mostraron algún signo clínico de la intoxicación. No obstante, solo murieron aquellos que recibieron una dosis de 20 g/kg de los frutos.
- * Los cerdos que consumieron 20 g/kg de frutos de *M. azedarach* manifestaron signos clínicos a las 2 horas posteriores a la ingestión de los mismos, muriendo de una a 3 horas después.
- * Las lesiones macro y microscópicas observadas en los animales intoxicados con frutos y hojas de *M. azedarach* no son específicas para esta planta tóxica y, por lo tanto, no son de valor diagnóstico concluyente.
- * Si bien los valores de CPK y AST aumentaron en forma correlativa con la dosis de frutos y hojas administradas, la cantidad de animales analizados no permite establecer un patrón concreto de variaciones de dichas enzimas que pueda ser empleado para la determinación indirecta de la intoxicación y valoración de su evolución.

K. BIBLIOGRAFÍA

1. AHN, J.; CHOI, S. and LEE, C. (1994). Cytotoxic limonoids from *Melia azedarach* var. *japonica*. *Phytochemistry* 36:1493-1496.
2. BAHRI, S.; SANI, Y. and HOOPER, P.T. (1992). Myodegeneration in rats fed *Melia azedarach*. *Aust. Vet. J.* 69:33.
3. BANKS, W.J. (1981). Digestive System. En: Banks WJ (ed.): *Applied Veterinary Histology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
4. BARBOSA, J.D.; ARMIÉN, A.G. e TOKARNIA, C.H. (1994). Intoxicação experimental por *Baccharis megapotamica* var. *werii* (Compositae) em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 14 (1):5-13.
5. BARROS, C.S.L. (1993). Intoxicação por *Baccharis coridifolia*. En: Riet-Correa, F.; Méndez, M.C.; Schild, A.L. (eds.). *Intoxicações por plantas e micotoxinoses em animais domésticos*. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, SRL, Uruguay, 159-169.
6. BRITO, M.F.; TOKARNIA, C.H. e PEIXOTO, P.V. (2001). Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimisoideae) em bovinos. 2. Achados anátomo e histopatológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 21(2):61-71.
7. CARRATALA, R.E. (1939). Intoxicación mortal por frutos de *Melia azedarach* L. (paraíso vegetal). *Rev. Asoc. Med. Argent.* 53:338-340.
8. CORBETT, J.V. (1987). *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures with Nursing Diagnoses*. 2nd ed. Los Altos, CA: Appleton & Lange.
9. EVERIST, S.L. (1974). *Poisonous Plants of Australia*. Angus and Roberts Pty Ltd, Sydney, Australia, 368-369.
10. GALLO, G.G. (1987). Plantas tóxicas para el ganado en el Cono Sur de América. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 49-52.
11. HARE, W.R.; SCHUTZMAN, H.; LEE, B.R. and KNIGHT, M.W. (1997). Chinaberry poisoning in two dogs. *JAVMA* 210:1638-1640.
12. HARE, W.R. (1998). Chinaberry (*Melia azedarach*) Poisoning in Animals. En: Garland T. and Barr AC. (eds.): *Toxic Plants and Other Natural Toxicants*. CAB International, 514-516.

13. HOTH, D.S.; SINGH, B.D.S.; KWATRA, M.S. and CHAWLA, R.S. (1976). A note on the comparative toxicity of *Melia azedarach* (DHREK) berries to piglets, buffalo-calves and fowls. *Journal of Research (Punjab Agricultural University)* 13:232-234.
14. HUANG, R.C.H.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T. and TADERA, K. (1995). Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 38:593-594.
15. HURST, E. (1942). *Poison plants of New South Wales*. Plants Committee. NSW, Sydney, Australia, 214-218.
16. KANEKO, J.J. (1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, California, 462-495.
17. KUPCHAN, S.M.; STEELMAN, D.R.; JARVIS, B.B.; DAILEY, R.G. and SNEDEN, A.T. (1977). Isolation of potent new antileukemic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. *J. Org. Chem.* 42:4221-4225.
18. KINGSBURY, J.M. (1964). *Poisonous Plants of the United States and Canada*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, NJ, 206-208.
19. KWATRA, M.S.; SINGH, B.D.S.; HOTH, D.S. and DHINGRA, P.N. (1974). Poisoning by *Melia azedarach* in pigs. *Vet. Rec.* 94:421.
20. MORRISON F.R.A; GRANT R.A. (1932). A contribution to the chemistry of the fruit obtained from the white cedar tree (*Melia azedarach* L. var. *australasica* CDC; syn. *Melia australasica* A. Juss.) growing in New South Wales, with notes on its reputed toxicity. *J. Proc. R. Soc. N S Wales* 65:153.
21. NAKATANI, M.; HUANG, R.C.H.; OKAMURA, H.; NAOKI, H. and IWAGAWA, T. (1994). Limonoid antifeedants from Chinese *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 36:39-41.
22. OELRICHS, P.B.; HILL, M.W.; VALLELY, P.J.; MACLEOD, J.K. and MOLINSKI, T.F. (1983). Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 22(2):531-534.
23. OELRICHS, P.B.; HILL, M.W.; VALLELY, P.J.; MACLEOD, J.K. and MOLINSKI, T.F. (1985). The chemistry and pathology of meliatoxins A and B constituents from the fruit of *Melia azedarach* L. var. *australasica*. En: Seawright, A.A.; Hegarty, M.P.;

- James, L.F. (eds.). Plant Toxicology. Yeerongpilly, Australia, Queensland Poisonous Committee, 387-394.
24. PAGANA, K.D. (1998). Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests. St. Louis: Mosby, Inc.
25. RAGONESE, A.E. (1956). Plantas tóxicas para el ganado en la región Central Argentina. Revista Facultad de Agronomía, La Plata, Argentina 31(2):220-224.
26. RUMMEL, R.J. Understanding Correlation.
<http://www.mega.nu:8080/ampp/rummel/uc.htm#D3.3>
27. SCHMIDT, M.; VON FORSTUER, M. (1986). Laboratory Testing in Veterinary Medicine. Diagnostic and clinical monitoring. Boheringer Mannheim, Mannheim.
28. TASAKA, A.C.; CALORE, E.E.; CAVALIERI, M.J.; DAGLI, M.L.Z.; HARAGUCHI, M. and GÓRNIAC, S.L. (1998). Experimental Poisoning in Rabbits Fed with *Senna occidentales* Seeds. En: Garland T. and Barr AC. (eds.): Toxic Plants and Other Natural Toxicants. CAB International, 527-530.
29. TIMM, C. e RIET-CORREA, F. (1997). Plantas tóxicas para suínos. Ciência Rural 27(3):521-528.
30. TOKARNIA, C.H. e DÖBEREINER, J. (1975). Intoxicação experimental em bovinos por “mio-mio”, *Baccharis coridifolia*. Pesq. Agrop. Bras. 10:79-97.
31. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. e PEIXOTO, P.V. (2000). Plantas Tóxicas do Brasil. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, Brasil, 62-72.
32. TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; GAVA, A. e BARROS, C.S.L. (1992). Intoxicação experimental por *Baccharis megapotamica* var. *megapotamica* e var. *weirii* (Compositae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 12:19-31.
33. TURSCH, B.; TURSCH, E.; HARRISON, I.T.; BRAZÃO DA SILVA, G.B.CH.T.C.; MONTEIRO, H.J.; GILBERT, B.; MORS, W.B. and DJERASSI, C. (1963). Terpenoids. LIII. Demonstration of ring conformation changes in triterpenes of the β amyrin class isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. J. Org. Chem. 28:2390-2394.
34. VARASCHIN, M.S.; BARROS, C.S.L. e JARVIS, B.B. (1998). Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 18(2):69-75.