

**FERNANDO HENRIQUE FURLAN GOUVÊA**

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA E EXPERIMENTAL POR *Sida carpinifolia*  
(Malvaceae) EM BOVINOS.**

**LAGES – SC**

**2007**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**

**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E PATOLOGIA**

**FERNANDO HENRIQUE FURLAN GOUVÊA**

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA E EXPERIMENTAL POR *Sida carpinifolia*  
(Malvaceae) EM BOVINOS**

Dissertação apresentada à coordenação do curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Aldo Gava

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Davi  
Traverso

**LAGES – SC**

**2007**

Gouvêa, Fernando Henrique Furlan  
Intoxicação espontânea e experimental por *Sida*  
*carpinifolia* (Malvaceae) em bovinos. / Fernando Henrique  
Furlan Gouvêa – Lages, 2007.  
43p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências  
Agroveterinárias / UDESC.

1. *Sida carpinifolia* 2. Bovino – Doenças.
3. Sistema nervoso – Degeneração. I. Título.

CDD – 636.208959

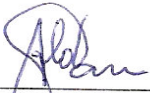
FERNANDO HENRIQUE FURLAN GOUVÊA

INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA E EXPERIMENTAL POR *Sida carpinifolia*  
(Malvaceae) EM BOVINOS.

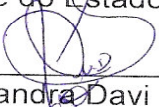
Dissertação aprovada pela coordenação do curso de Mestrado de Ciências Veterinárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Banca examinadora:**

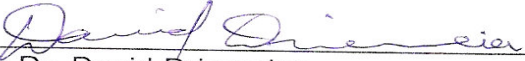
Orientador:

  
Prof. Dr. Aldo Gaya  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

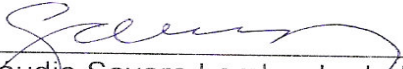
Co-orientadora:

  
Prof.ª Dr.ª Sandra Davi Traverso  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:

  
Prof. Dr. David Driemeier  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Membro:

  
Prof. Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Lages, 05 de Março de 2007



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor, orientador e acima de tudo Amigo Aldo Gava pelos ensinamentos, por acreditar em meu potencial, por me acolher e sempre estender a mão nas horas em que precisei. Obrigado “Chefe”.

À minha família, em especial à minha mãe, meus tios Cláudio e Carlos e ao meu primo Carlinhos; pessoas sem as quais este e muitos outros sonhos não se realizariam.

Ao Professor Edson Moleta Colodel, da Universidade Federal de Mato Grosso, por me ajudar a dar o primeiro passo em minha formação em Patologia Veterinária.

À Universidade do Estado de Santa Catarina pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de monitoria de pós – graduação e em especial ao Laboratório de Patologia Animal pelo ambiente familiar e caloroso acolhimento.

Ao Professor Severo Sales de Barros, da Universidade Federal de Pelotas, pela realização do exame Ultra-estrutural.

Aos Professores, técnicos e bolsistas do Laboratório de Patologia Animal pela convivência e amizade.

À Fernanda Jönck pela amizade, afeto e carinho, principalmente nos momentos mais difíceis.

Às amigas Joelma Lucieli, Vanessa Borelli, Luciane Veronezi, Daniela Lentz pelo auxílio, amizade, risadas e trapalhadas nesse tempo de convivência, em especial à Jô “meine Schwester” pela amizade sempre sincera e por sempre fazer as compras para mim quando eu ficava até mais tarde no laboratório.

Aos Alunos, na época, em estágio extracurricular João Ruthes da UFPR e D.J. da UFRGS pelo grande auxílio nas coletas de planta.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho, e em especial àqueles que ajudaram, mesmo com alguns poucos gramas, na coleta dos 2.900 kilos de *Sida carpinifolia* utilizados nesse trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de capacitação.

À todos agradeço de coração!

"A excelência pode ser obtida se você se importa mais do que os outros julgam ser necessário; se arrisca mais do que os outros julgam ser seguro, sonha mais do que os outros julgam ser prático, e espera mais do que os outros julgam ser possível."

**Vince Lombardi**

"Sempre faço o que não consigo fazer para aprender o que não sei!"

**Pablo Picasso**

## RESUMO

Descrevem-se os dados epidemiológicos e os achados clínicos e patológicos da intoxicação espontânea e experimental por *Sida carpinifolia* em bovinos. Foi realizado levantamento sobre a ocorrência da doença espontânea em bovinos em municípios da região do Alto Vale do Itajaí-SC. Clinicamente foram avaliados 16 bovinos doentes e destes, 9 foram necropsiados. Para a reprodução experimental da doença, folhas verdes de *S. carpinifolia* foram coletadas semanalmente na região do Alto Vale do Itajaí e fornecidas *in natura* diariamente para 5 bovinos nas doses de 10 e 20g/Kg, por 120 dias, 40g/Kg por 30 dias e 30 e 40g/Kg por 150 dias. Ao final do período de consumo da planta os bovinos foram eutanasiados. Os principais sinais clínicos consistiam de andar em marcha, olhar atento, tremores de cabeça e subdesenvolvimento. Histologicamente e ultra-estruturalmente a lesão predominante foi a vacuolização e tumefação de neurônios (principalmente os de Purkinje), das células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide. Os sinais clínicos e as lesões foram acentuados nos bovinos espontaneamente intoxicados e variaram de leve a acentuado, nos bovinos experimentais conforme a dose de planta e tempo de consumo. Em animais espontaneamente intoxicados e eutanasiados após um período de até 150 dias sem consumir a planta os sinais clínicos amenizaram, porém lesões residuais caracterizadas principalmente por esferóides axonais e ausência de neurônios de Purkinje em algumas áreas do cerebelo foram verificadas. *S. carpinifolia* causa doença de depósito lisossomal em bovinos quando consumida por período prolongado, mesmo em pequenas doses.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Sida carpinifolia*, bovino, doença de armazenamento, alfa-manosidose.

## ABSTRACT

Epidemiological data, clinical and pathological findings of the spontaneous and experimental poisoning by *Sida carpinifolia* in cattle are described. A survey on field cases of *Sida carpinifolia* in cattle was carried out in farms of the Alto Vale do Itajaí region of the Brazilian state of Santa Catarina. Sixteen affected cattle were clinically evaluated and 9 were necropsied. For the experimental reproduction of the disease, fresh green leaves weekly harvest in the same region where spontaneous case occurred were force-fed orally to five cattle at doses of 10 and 20g/kg/body weight (bw) for 120 days; 40g/kg/bw for 30 days and 30 and 40g/kg/bw for 150 days. At the end of the experiment the 5 experimental cattle were euthanatized. The main clinical signals consisted of marching gait, alert gaze, tremors of head and poor growth. Histological and ultrastructural main lesions consisted of vacuolization and distension of neuronal perikarya (mainly from Purkinje cells), and of the cytoplasm of acinar pancreatic cells and thyroid follicular cells. The clinical signs and the lesions were more marked in cattle from field cases and varied from mild to marked in experimentally poisoned cattle, depending on the dose size and the length of the period of consumption. In cattle from field cases and in those euthanatized after a period of up to 150 days without consuming the plant there was amelioration of clinical signs, however residual lesions mainly characterized for axonal spheroids and absence of Purkinje neurons of in some areas of the cerebellum were observed in those cases. It is concluded that ingestion of even small amounts *S. carpinifolia* for prolonged periods of time causes lisosomal storage disease in cattle.

**KEY-WORDS:** *Sida carpinifolia*, bovine, lisosomal storage disease, alpha-mannosidosis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intoxicação espontânea por <i>S. carpinifolia</i> . Identificação, idade, sexo e raça dos bovinos.....	10
Tabela 2 - Delineamento do experimento com <i>S. carpinifolia</i> verde em bovinos.....	11
Tabela 3 - Dados epidemiológicos dos surtos onde ocorreu intoxicação espontânea por <i>S. carpinifolia</i> em bovinos.....	16
Tabela 4 - Variação de peso médio/dia de bovinos experimentalmente intoxicados com <i>S. carpinifolia</i> .....	23
Tabela 5 - Tempo de consumo de planta para início das alterações neurológicas e intensidade dos sinais clínicos relacionados à dose diária de planta em bovinos experimentalmente intoxicados com <i>S. carpinifolia</i> .....	24
Tabela 6 - Identificação, consumo diário, período de consumo, total de planta consumida, período sem consumo, intensidade dos sinais clínicos e principais lesões microscópicas observadas em bovinos espontaneamente e experimentalmente intoxicados por <i>S. carpinifolia</i> .....	30

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Forma do alcalóide swainsonina e da D-manose.....8
- Figura 2 – **a.** *Sida carpinifolia*. **b.** Área invadida por *S. carpinifolia* ( Município de José Boiteux-SC).....12
- Figura 3 – Mapa do Estado de Santa Catarina. Divisão por região.....12
- Figura 4 – Mapa da região do Alto Vale do Itajaí. Em marrom, municípios onde foi diagnosticado intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* .....12
- Figura 5 – Regiões analisadas do SNC (COLODEL, 2005). **a.** Regiões do SNC onde foram realizados cortes para estudar a doença. **b.** Região 1, corte transversal do córtex cerebral rostralmente ao quiasma óptico. **c.** Região 2, corte transversal do córtex cerebral e tálamo caudal ao corpo mamilar. **d.** Região 3, mesencéfalo cortado transversalmente sobre a fossa interpeduncular. **e.** Região 4, corte transversal do cerebelo e ponte sobre o pedúnculo cerebelar. **f.** Região 5, corte transversal do bulbo sobre o óbex.....15
- Figura 6 – Intoxicação natural por *Sida carpinifolia*. **a.** Piquete com grande quantidade de *S. carpinifolia* onde ocorreu o surto 4. **b.** Detalhe de **a.** **c.** Bovino 2. Subdesenvolvimento e posição de base larga. **d.** Bovino 5. Subdesenvolvimento, tamanho da cabeça desproporcional ao corpo e posição de base larga. **e.** e **f.** Bovino 1 e 6, respectivamente. malformação dos dentes e gengiva.....18
- Figura 7 – Intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* (HE). **a.** Bovino 4. Neurônio encarquilhado com núcleo picnótico, citoplasma eosinofílico e bordos citoplasmáticos irregulares (seta) (objetiva 40x). Cerebelo. **b.** Bovino 2. Cerebelo. Área com rarefação de neurônios de Purkinje e proliferação de células gliais de Bergman (objetiva 20x). **c.** Bovino 9. Esferóide axonal na camada de células granulares do cerebelo (seta) (objetiva 20x). **d.** Bovino 4. Bulbo. Esferóide axonais (setas) (objetiva 20x). **e.** Bovino 5. Cerebelo. Vacuolização em neurônio de Purkinje (objetiva 40x). **f.** Bovino 6. Cerebelo. Vacuolização em neurônio de Purkinje com tumefação e vacuolização axonal (seta) (objetiva 40x).....20

Figura 8 Intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* (HE). **a.** e **b.** Bovinos 6 e 8, respectivamente. Vacuolização em células acinares pancreáticas (objetiva 40x). **c.** Bovino 6. Vacuolização em neurônio da camada de células granulares do cerebelo (objetiva 40x). **d.** Bovino 6. Neurônios do ramo ventral da medula espinhal vacuolizados (objetiva 20x). **e.** Bovino 6. Vacuolização de células do epitélio da glândula salivar (objetiva 20x). **f.** Bovino 8. Vacuolização de neurônios do plexo mioentérico (objetiva 40x).....21

Figura 9 - Intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* (HE). Todas as fotos são dos bovinos 6 e 8 respectivamente. **a.** e **b.** Neurônios encarquilhados (setas) (objetiva 10x) e vacuolização e encarquilhamento (setas) (objetiva 20x) em neurônios do gânglio trigeminal. **c.** e **d.** Vacuolização em neurônios de núcleos do bulbo (objetiva 20x e objetiva 40x). **e.** e **f.** Vacuolização em células foliculares da tireóide (objetiva 40x).....22

Figura 10 – Intoxicação experimental por *S. carpinifolia*. **a.** Bovino 14 (40g/Kg) comendo o restante da dose de *S. carpinifolia* do dia após voltar do período de pastejo. **b.**, **c.**, **d.** e **e.** Bovino 13 (30g/Kg) e 14, respectivamente. Distúrbios proprioceptivos. **F.** Bovino 14 em queda após o HR test.....25

Figura 11 – Intoxicação experimental por *S. carpinifolia* (HE). **a.** Bovino 12 . Cerebelo. Vacuolização de neurônio de Purkinje, ao lado neurônio encarquilhado (seta) (objetiva 40x). **b.** Bovino 10 (10g/Kg/120 dias). Vacuolização em neurônios de Purkinje e vacúolos com conteúdo finamente granular na camada molecular do cerebelo (setas) (objetiva 20x). **c.** Bovino 12 (40g/Kg/30 dias). Vacuolização em células acinares pancreáticas (objetiva 20x). **d.** Bovino 10. Vacuolização em células foliculares da tireóide (objetiva 20x). **e.** Bovino 13. Vacuolização difusa em neurônio de Purkinje (objetiva 10x). **f.** Bovino 14 (40g/Kg/150 dias). Vacuolização em neurônio da camada de células granulares do cerebelo (objetiva 40x).....27

Figura 12 – Intoxicação experimental por *S. carpinifolia* (HE). **a.** Bovino 13 (30g/Kg/150 dias). Vacuolização em células acinares pancreáticas (objetiva 20x). **b.** Bovino 14 (40g/Kg/150 dias). Vacuolização em neurônios do bulbo (objetiva 20x). **c.** Bovino 13. Esferóides axonais no bulbo (setas) (objetiva 20x). **d.** Bovino 13. Vacuolização em neurônios da medula espinhal (objetiva 20x). **e.** e **f.** Bovino 14. Vacuolização em células foliculares da tireóide e em células epiteliais do epidídimo (objetiva 20x).....28

Figura 13 – Intoxicação por *S. Carpinifolia*. **a.** Pericário de neurônio de Purkinje com vacúolos delimitados por membranas, alguns contendo material finamente granular (setas) (Barra = 0,5µm). **b.** Citoplasma de célula folicular da tireóide com grânulos de secreção eletrodensos (setas) e vacúolos delimitados por membranas contendo material finamente granular (cabeças de setas) (Barra = 3µm).....29



## SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográfica.....	2
2.1 <i>Sida carpinifolia</i> : Aspectos botânicos, farmacotoxicológicos e químicos.....	2
2.2 Epidemiologia, aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por <i>S. carpinifolia</i> .....	3
2.3 Doenças de Depósito Lisossomal (DDLs).....	5
2.4 Alfa-Manosidose.....	6
2.4.1 Swainsonina: Um potente inibidor da alfa-manosidase.....	7
2.4.2 Alfa-manosidose induzida por plantas que contém swainsonina.....	9
3 Material e Métodos.....	10
3.1 Históricos.....	10
3.2 Estudo Experimental.....	11
3.3 Exame Clínico.....	12
3.4 Eutanásia.....	14
3.5 Necropsia e Coleta de Amostras.....	14
3.6 Análise das Amostras.....	14
3.6.1 Microscopia óptica.....	14
3.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	14
4 Resultados Obtidos.....	16
4.1 Intoxicação Espontânea.....	16

4.1.1 Epidemiologia, sinais clínicos e lesões macroscópicas.....	16
4.1.2 Exame histológico.....	19
4.2 Intoxicação Experimental.....	23
4.2.1 Sinais clínicos e lesões macroscópicas.....	23
4.2.2 Exame Histológico.....	26
4.3 Microscopia Eletrônica.....	26
5 Discussão.....	31
6 Conclusões.....	37
7 Referências Bibliográficas.....	38

## 1. INTRODUÇÃO

Uma enfermidade de caráter crônico, caracterizada por tremores de cabeça e pescoço, olhar atento, ataques epileptiformes, andar cambaleante e subdesenvolvimento ocorre em bovinos no Alto Vale do Itajaí-SC. Em todas as propriedades onde a doença foi diagnosticada observou-se grande quantidade de *Sida carpinifolia*, que tinha sinais de ter sido consumida pelos bovinos.

Enfermidades tremogênicas de bovinos, são freqüentes no Sul do Brasil, e geralmente são ocasionadas por fitotoxinas. As plantas de ação sobre o sistema nervoso central é um grupo bem representado no Brasil. Dentro desse grupo existem as plantas que causam, entre outros sinais, tremores principalmente de cabeça e pescoço, sendo por isso chamadas plantas tremogênicas. Entre elas estão: *Phalaris angusta* (GAVA et al, 1999; SOUSA e IRIGOYEN, 1999), *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* (RIET-CORREA et al., 1983a), *Ipomoea* sp. (BALOGH et al., 1999), *Turbina cordata* (DANTAS et al., 2006), *S. carpinifolia* (DRIEMEIER et al., 2000) e os fungos *Claviceps paspali* (RIET-CORREA et al., 1983b) e *Aspergillus clavatus* (LORETTI et al., 2003b).

*S. carpinifolia*, da família Malvaceae, é uma planta daninha bastante freqüente em locais úmidos e sombreados, infestando principalmente pastagens e terrenos baldios (LORENZI, 2000). Essa planta é responsável por produzir doença de depósito lisossomal em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a, GODOY et al., 2005), pôneis (LORETTI et al., 2003a), ovinos (SEITZ et al., 2005) e bovinos (FURLAN et al., 2005). Os principais sinais clínicos em caprinos e ovinos são incoordenação, ataxia com dismetria e tremores de cabeça associados a quedas freqüentes. Na necropsia não são observadas lesões. Microscopicamente as lesões mais significativas limitam-se ao sistema nervoso central e são caracterizadas por vacuolização citoplasmática de neurônios (principalmente os de Purkinje) e de células da glia (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; FURLAN et al., 2005; GODOY et al., 2005; SEITZ et al., 2005).

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar a epidemiologia, sinais clínicos bem como lesões macroscópicas e microscópicas da intoxicação natural e experimental por *S. carpinifolia* em bovinos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Sida carpinifolia*: ASPECTOS BOTÂNICOS, FARMACOTOXICOLÓGICOS E QUÍMICOS.

*Sida carpinifolia* é uma *Angiospermae* da família *Malvaceae* e tem como sinonímia *S. acuta*, *S. acuta* var. *carpinifolia* e *S. Acuta* spp. *carpinifolia*. É conhecida como guanxuma, malva-branca, chá-da-índia, vassoura (KISSMANN e GROTH, 1995; LORENZI, 2000). Na região do Alto Vale do Itajaí – SC *Sida carpinifolia* é conhecida como mata-pasto (observações pessoais), é uma planta daninha bastante freqüente em locais úmidos e sombreados, infestando principalmente pastagens e terrenos baldios (LORENZI, 2000).

Na medicina popular *S. carpinifolia*, sob forma de infusões, é utilizada como emoliente em afecções respiratórias, como tônica, antipirético e anti-hemorroidal. Suas raízes amargas possuem ação antipirética e estomáquica. Dessa planta já foi isolado os ácidos oléico, linoléico, palmítico, esteárico e araquidônico e as substâncias beta-sitosterol, ecdisterona, rutina, quercitina, saponinas, taninos, cumarinas, flavanóides (HENRIQUES et al., 1989), além do alcalóide indolizidínico swainsonina (COLODEL et al., 2002b). Essa planta possui ação simpatomimética devido a um alcalóide semelhante à efredina, ação anti-placa no tratamento da cárie dentária (HENRIQUES et al., 1989), causa infertilidade em ratos (KHOLKUTE et al., 1978) e doença de depósito lisossomal em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; GODOY et al., 2005), pôneis (LORETTI et al., 2003a), ovinos (SEITZ et al., 2005) e bovinos (FURLAN et al., 2005).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA, ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INTOXICAÇÃO POR *S. carpinifolia*.

A intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* foi descrita em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005; GODOY et al., 2005), ovinos (SEITZ et al., 2005) e pôneis (LORETTI et al., 2003a). Essa planta tem sido responsabilizada por produzir doença nervosa em bovinos, no estado de Santa Catarina (FURLAN et al., 2005) e Rio Grande do Sul, (BARROS et al., 2006).

Em caprinos os surtos são observados, de modo geral, em pequenas propriedades onde *S. carpinifolia* é vegetação infestante e por vezes predominante nos piquetes (COLODEL et al., 2002a).

O quadro clínico produzido por essa planta é semelhante para caprinos, bovinos e ovinos e é caracterizado principalmente por sinais nervosos. Os animais mais gravemente afetados apresentam olhar atento, movimentação lenta, incoordenação motora associada à dismetria grave, hiperestesia, balanço contínuo de cabeça e pescoço, além de quedas freqüentes com decúbitos prolongados e dificuldade para voltar à estação (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005 ; SEITZ et al., 2005, FURLAN et al., 2005; GODOY et al., 2005). Fezes pastosas ou diarréicas e emagrecimento foram observadas em ovinos (SEITZ et al., 2005) e em caprinos (COLODEL, et al., 2002a; COLODEL, 2005). Em bovinos também foi observado subdesenvolvimento (FURLAN et al., 2005). Os sinais clínicos se acentuam quando as animais são movimentados (COLODEL et al., 2002a).

A doença tem curso crônico, os animais podem sobreviver por vários meses após o início dos sinais clínicos e a morte ocorre, de modo geral por acidentes como quedas e afogamentos (COLODEL et al., 2002a). Em pôneis espontaneamente intoxicados com *S. carpinifolia* o quadro clínico verificado inclui andar duro, tremores musculares generalizados, sinais de dor abdominal caracterizados por chutes no flanco, rolamento, quedas e gemidos, seguidos de recumbência e morte. O início da doença é abrupto com curso superagudo, ocorrendo a morte em até 24 horas após início dos sinais clínicos (LORETTI et al., 2003a).

Em caprinos, problemas reprodutivos como abortos e morte de recém nascidos podem ocorrer quando animais prenhes consomem *S. carpinifolia* (DRIEMEIER et al., 2000), porém após alguns meses sem ingerir a planta podem emprenhar e parir filhotes normais (COLODEL et al., 2002a). Em pôneis não foram

verificados problemas reprodutivos em animais espontaneamente intoxicados (LORETTI et al., 2003a).

Na necropsia não são observadas lesões macroscópicas importantes. Os principais achados microscópicos são observados no SNC e são semelhantes para todas as espécies caracterizando-se por distensão e vacuolização citoplasmática, mais evidente nas células de Purkinje do cerebelo (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; LORETTI et al., 2003a; COLODEL, 2005; FURLAN et al., 2005; GODOY et al., 2005; SEITZ et al., 2005). Em caprinos e ovinos também podem ser encontrados esferóides axonais na camada de células granulares do cerebelo (COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005; SEITZ et al., 2005). Vacuolização citoplasmática em graus variáveis podem também ser observadas no epitélio dos ácinos pancreáticos, em células foliculares da tireóide (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005; SEITZ et al., 2005), nos túbulos renais (SEITZ et al., 2005; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005), nos hepatócitos (DRIEMEIER et al., 2000; SEITZ et al., 2005), epitélio de glândulas salivares e do epidídimo (COLODEL et al., 2002a, COLODEL, 2005) e em macrófagos de órgãos linfóides (COLODEL et al., 2002a; SEITZ et al., 2005).

Nos estudos realizados em ovinos foi constatado que alguns dias após cessar o consumo da planta pode haver recuperação clínica dos animais com ausência de lesões em animais levemente afetados (SEITZ et al., 2005). Em caprinos e ovinos com sinais clínicos acentuados, há recuperação clínica, porém ao exame histológico verifica-se eosinofilia citoplasmática, picnose nuclear além de desaparecimento das células de Purkinje (COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005; SEITZ et al., 2005).

Ultra - estruturalmente verificam-se vacúolos delimitados por membranas, por vezes contendo material finamente granular (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL, 2005; SEITZ et al., 2005).

Em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000) e em pôneis (LORETTI et al., 2003a) essa doença foi caracterizada através da técnica de histoquímica com lectinas como alfa-manosidose, uma doença de depósito lisossomal.

### 2.3 DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSOMAL (DDLs)

Lisossomas são organelas de formato redondo ou ovalado de 0,2 a 0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro (AGAMANOLIS, 1995). Constituem o principal centro de eliminação e reciclagem das células. Esses corpúsculos catabolizam macromoléculas celulares e extracelulares, gerando aminoácidos, ácidos graxos, ácidos nucleicos e açúcares para reutilização na síntese celular. A degradação de todas as macromoléculas biológicas é mediada por grandes concentrações de hidrolases ácidas (KING e ALROY, 2000; WARREN e ALROY, 2000), são elas: fosfatases, nucleases, glicosidases, proteases, peptidases, sulfatases e fosfolipases, aproximadamente 50 e têm atividade máxima em  $\text{pH} \approx 5,0$  (AGAMANOLIS, 1995).

Essas enzimas são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático rugoso (RE) e translocadas até o aparelho de Golgi (AG), onde recebem a adição de um resíduo manose-6-fosfato terminal que as segrega do restante das proteínas recém sintetizadas. Esse resíduo serve como marcador de identificação para receptores específicos localizados na membrana plasmática, e também nas membranas do RE e do AG (KING e ALROY, 2000). Apenas duas enzimas, glicocerebrosidase e fosfatase ácida estão localizadas na membrana lisossomal e não requerem o marcador (AGAMANOLIS, 1995). Depois que as enzimas se ligam ao receptor de membrana do AG, o complexo enzima-receptor deixa essa organela na forma de vesículas limitadas por membrana, que se transformam em lisossomas primários (KING e ALROY, 2000). No lisossoma primário, a hidrolase é liberada de seu marcador (manose-6-fosfato) pela acidificação do compartimento, e assim a enzima assume sua conformação ativa (WINCHESTER, 2005). Constituintes extracelulares ou intracelulares são transportados para serem catabolizados nos lisossomas. Tão logo as macromoléculas tenham sido catabolizadas, os produtos de degradação são transferidos para o citosol, por uma combinação de difusão passiva e transportadores específicos, para serem reutilizados (AGAMANOLIS, 1995; KING e ALROY, 2000; WINCHESTER, 2005).

Normalmente, a maioria das hidrolases lisossômicas está presente em quantidade suficientemente alta para que seu respectivo substrato não se acumule. O acúmulo de substrato não degradado ocorre quando a atividade residual é abaixo do nível crítico de 10-15% da atividade normal enzimática (LEINEKUGEL et al., 1992; KING e ALROY, 2000), levando a um comprometimento grave da estrutura e

funcionamento da célula (KING e ALROY, 2000). A lesão celular nas DDLs deve-se principalmente aos efeitos mecânicos causados pelo depósito anormal de substratos, são eles: a alteração na circulação citoplasmática e a impactação de axônios e dendritos. A severidade do depósito depende da quantidade de substrato processado pela célula (AGAMANOLIS, 1995). O substrato acumulado em cada célula é influenciado pela composição e taxa de reciclagem da membrana celular, habilidade fagocítica da célula e pela natureza dos substratos fagocitados. Como consequência, diferentes tipos celulares são afetados diferentemente, e algumas células podem não mostrar alteração alguma (WARREN e ALROY, 2000). Duas classes celulares são mais vulneráveis: os neurônios devido ao seu grande tamanho, grande quantidade de gangliosídeos em sua membrana celular e por serem células *post* mitóticas e as células fagocíticas devido à sua grande carga de diferentes substratos a serem digeridos (SUMMERS et al., 1994; AGAMANOLIS, 1995).

O diagnóstico é realizado através de técnicas bioquímicas, morfológicas (ALROY et al., 1987), e moleculares (LUZI et al., 1997). A maioria das DDLs são diagnosticadas demonstrando-se a atividade deficiente da enzima no plasma, em leucócitos ou em culturas de fibroblastos, bem como pela caracterização do substrato não degradado armazenado nos lisossomas de células afetadas ou excretados por via urinária (WARREN e ALROY, 2000).

Muitas DDLs têm sido reportadas em animais domésticos. Algumas delas como casos isolados envolvendo animais de companhia ou de produção, mas outras são de grande importância econômica ou podem servir como modelo para estudo de doenças humanas análogas (JOLLY e WALKLEY, 1997).

## 2.4 ALFA-MANOSIDOSE

Apesar de ser rara em humanos, a alfa-manosidose é provavelmente a mais comum e economicamente importante DDL dos animais domésticos. Na Nova Zelândia mais de 10% dos bovinos Angus eram heterozigotos para alfa-manosidose antes do início de um programa de controle (JUBB e HUXTABLE 1992; JOLLY e WALKLEY, 1997). A doença é caracterizada pelo depósito intracelular e excreção urinária de oligossacarídeos contendo manose, causado pela deficiência na atividade da enzima alfa-manosidase lisossomal (JOLLY et al., 1981). Sua forma



congenita já foi descrita em bovinos da raça Angus (WHITTEM e WALKEER, 1957), humanos (OCKERMAN, 1967), felinos domésticos (BURDITT et al., 1980; MAENHOUT et al., 1988) e em cobaias (MUNTZ et al., 1999). Em bovinos é uma doença neurológica hereditária autossômica recessiva (KING e ALROY, 2000) afetando principalmente bovinos da raça Angus e seus cruzamentos como Galloway e Murray Grey (JUBB e HUXTABLE 1992; JOLLY e WALKEY, 1997). Clinicamente a doença caracteriza-se por ataxia, incoordenação, tremores de cabeça, agressividade, baixo desenvolvimento corporal e morte (RADOSTITS et al., 2002). À necropsia observa-se hidrocefalia moderada, linfadenopatia e hepatomegalia. O exame histológico revela quantidade variável de vacúolos citoplasmáticos em neurônios (principalmente os de Purkinje) e neuroglia, macrófagos, fibroblastos, endotélio vascular, pericitos e células de epitélio glandular (principalmente pâncreas e tireóide). Esferóides axonais são um achado constante. Ultraestruturalmente os vacúolos mostram-se como vesículas circundadas por uma membrana. Os vacúolos de depósito lisossomal estão geralmente vazios devido à solubilidade do material. Apesar da maioria das vesículas serem eletroluscentes elas, às vezes, contém uma quantidade moderada de material amorfo eletrodenso e ocasionalmente fragmentos de membranas ou material fibrilar (JOLLY e THOMPSON, 1978; SUMMERS et al., 1994).

Uma forma adquirida de alfa-manosidose de herbívoros ocorre secundariamente à ingestão de plantas que contém o alcalóide indolizidínico swainsonina, um potente inibidor da alfa-manosidase lisossômica. Esta doença, embora muito similar à alfa-manosidose congênita, não é idêntica, pois a swainsonina, além da alfa-manosidase lisossomal, inibe também a alfa-manosidase II do Aparelho de Golgi, interferindo na produção de oligossacarídeos do tipo complexo (JOLLY, 1974; JOLLY e WALKEY, 1997).

#### 2.4.1 Swainsonina: um potente inibidor da alfa-manosidase

Swainsonina, um alcalóide poli - hidroxilado e solúvel em água, foi isolado pela primeira vez da leguminosa *Swainsona canescens* (COLEGATE et al., 1979). Posteriormente foi demonstrada sua presença em plantas dos gêneros *Astragalus*, *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp. (MOLYNEUX e JAMES, 1982), *Ipomoea* (MOLYNEUX et al., 1995; BALOGH et al., 1999; HARAGUCHI et al., 2003), *Sida* (COLODEL et al., 2002b) e *Turbina* (DANTAS et al., 2006), sendo também

produzida pelos fungos *Rhizoctonia leguminicola* (SCHNEIDER et al., 1983) e *Metarhizium anisopliae* (SIM e PERRY, 1997). Fungos endófitos de *Astragalus* e *Oxytropis* (*Alternaria* sp. e *Embellisia* sp.) podem também produzir swainsonina (BRAUM et al., 2003; GARDNER et al., 2004), sendo esta uma importante explicação para a variação da toxicidade em populações dessas plantas, pois quando elas crescem sem esses fungos, perdem seu efeito tóxico (ROMERO et al., 2002). Swainsonina pode também ser sinteticamente produzida através de diversas técnicas (PEARSON e HEMBRE, 1996; RAZAVI e POLT, 2002; LINDSAY e PYNE, 2002).

O alcalóide é permeável à membrana plasmática celular e tem característica lisossomotrófica, acumulando-se rapidamente nos lisossomas (CHOTAI et al., 1983). Swainsonina é um potente inibidor da alfa manosidase lisossômica (DORLING et al., 1980; ELBEIN et al., 1981; CHOTAI et al., 1983), resultando no acúmulo e excreção de oligossacarídeos parcialmente degradados. Esse alcalóide inibe também a alfa manosidade II do AG modificando assim a síntese e excreção de glicoproteínas (TULSIANI et al., 1982; TULSIANI e TOUSTER, 1983).

O mecanismo de inibição se dá devido ao fato do alcalóide ter estrutura similar à de um cátion intermediário da hidrólise da manose (Figura 1). A alfa-manosidase lisossomal e a alfa-manosidase II do AG são inibidas, possivelmente por ligação competitiva com swainsonina (DORLING et al., 1980).

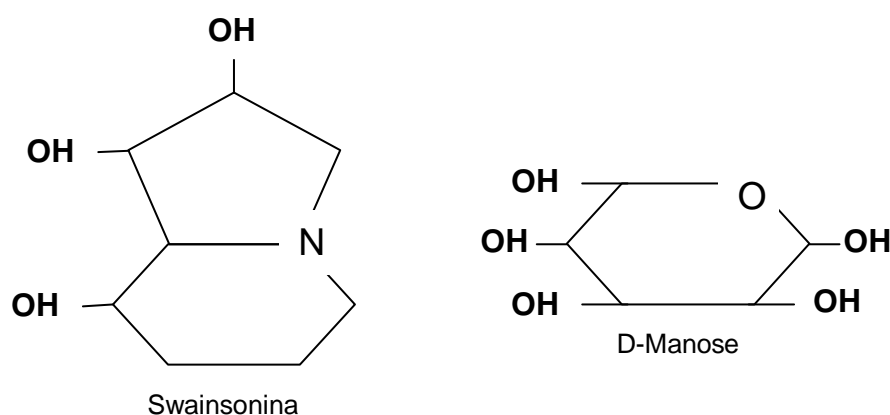


Figura 1 – Forma do alcalóide swainsonina e da D-manose.

Fonte: DORLING et al., 1980.

O principal produto, que se acumula nos lisossomas, resultante do catabolismo de glicoproteínas na deficiência da alfa manosidase lisossomal induzida por swainsonina, não é mais abundante na urina que a glicoproteína anormal resultante da ação do alcalóide sobre a alfa manosidase II do AG. Entretanto a síntese anormal de glicoproteínas na presença de swainsonina tem pouco efeito sobre a saúde dos animais, ou seja, a doença induzida pelo consumo de plantas contendo swainsonina é essencialmente uma DDL (ABRAHAM et al., 1983).

#### 2.4.2 Alfa-manosidose induzida por plantas que contêm swainsonina.

Acredita-se que nos Estados Unidos *Astragalus* sp. e *Oxytropis* sp. são as mais importantes e destrutivas das plantas tóxicas. As plantas desse gênero que causam DDLs são conhecidas como *locoweeds*, a doença causada por elas é denominada *locoism*. *Loco* é uma palavra derivada do espanhol que está associada ao quadro neurológico observado nos animais afetados (JAMES et al., 1981). Já as plantas do gênero *Swainsona* são conhecidas na Austrália como “ervilhas venenosas” (*poison peas*). As doenças causadas por essas plantas já são reconhecidas há muito tempo (LAWS e ANSON, 1968; JAMES et al., 1981). Essas plantas contêm swainsonina (COLEGATE et al., 1979; MOLYNEUX e JAMES, 1982) e seu consumo leva à uma alfa-manosidose (DORLING et al., 1978). Plantas do gênero *Ipomoea* também causam DDLs como mostram os trabalhos de Darmir et al. (1987) no Sudão, Balogh et al. (1999) em Moçambique e Armesto et al. (2004) na Argentina.

No Brasil DDLs associadas à swainsonina têm sido verificadas em intoxicações por *Ipomoea sericophylla*, *I. riedelii* (BARBOSA et al., 2006), *I. carnea* (BARROS et al., 2006, ARMIÉN, et al., 2007), *Turbina cordata* (DANTAS et al. 2006) e *S. carpinifolia* (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; LORETTI et al., 2003a; SEITZ et al., 2005; FURLAN et al., 2005; GODOY et al., 2005).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 HISTÓRICOS

Um levantamento sobre a ocorrência de doença em bovinos com sinais nervosos foi realizado em quatro municípios da região do Alto Vale do Itajaí - SC. Foram avaliados clinicamente 16 animais doentes e nove foram necropsiados (Tabela 1) para observação de lesões macroscópicas e coleta de amostras para microscopia óptica. Para microscopia eletrônica foram coletadas amostras do bovino 6.

Tabela 1 – Intoxicação espontânea por *S.carpinifolia*. Identificação, idade, sexo e raça dos bovinos.

Bovino	Idade (meses)	Sexo	Raça
1	36	Fêmea	Mestiço
2	36	Fêmea	Mestiço
3	36	Fêmea	Mestiço
4	48	Macho	Jersey
5	36	Fêmea	Mestiço
6	36	Fêmea	Jersey
7	24	Fêmea	Mestiço
8	24	Fêmea	Mestiço
9	48	Fêmea	Mestiço

### 3.2 ESTUDO EXPERIMENTAL

Folhas verdes de *S. carpinifolia* (Figura 2a e 2b) foram coletadas semanalmente na região do Alto Vale do Itajaí (Figura 3), nos municípios de José Boiteux, Vitor Meireles, Witmarsum e Rio do Sul (Figura 4), sendo conservadas em câmara fria e fornecidas, *in natura*, diariamente aos animais no período da manhã e início da tarde (das 8 às 14 horas). No período da tarde (14 às 18 horas) os animais eram soltos para pastoreio em piquete formado por capim quicuío (*Pennisetum clandestinum*) e azevém (*Lolium multiflorum*), e recebiam água à vontade. No período da noite os animais eram recolhidos para suas respectivas baias.

Para o estudo experimental, foram utilizados cinco bovinos oriundos de propriedade livre de *S. carpinifolia*, os quais foram mantidos em baias individuais. O delineamento do experimento está ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamento do experimento com *S. carpinifolia* verde em bovinos.

Bovino n <sup>o</sup>	Idade (meses)	Sexo	Raça	Dose (g/kg/dia)	Tempo (dias)
10	24	Macho	HPB <sup>a</sup>	10	120
11	18	Macho	HPB	20	120
12	16	Macho	Jersey	40	30
13	24	Macho	Jersey	30	150
14	18	Macho	Jersey	40	150

a – Holandês Preto e Branco.

O experimento foi conduzido em duas etapas. Para a 1ª etapa (bovinos 10, 11 e 12) a planta foi coletada no período de outubro a dezembro de 2005 e para a 2ª etapa (bovinos 13 e 14) no período de fevereiro a julho de 2006. No final do período experimental todos os animais foram eutanasiados e necropsiados.

### 3.3 EXAME CLÍNICO

Durante o período em experimentação os bovinos eram observados diariamente, avaliando-se comportamento, movimentação espontânea e induzida, consistência das fezes, coloração das mucosas e realização do HR test “head raising test” (PIENAAR et al.,1976) que consiste em levantar a cabeça do animal dorso caudalmente ao tronco e soltá-la após 60 segundos, sendo considerado positivo quando o animal apresenta sinais neurológicos.



Figura 2- a. *Sida carpinifolia*. b. Área invadida por *S. carpinifolia* (Município de José Boiteux-SC).



Figura 3 – Mapa do Estado de Santa Catarina. Divisão por região.

Fonte: Agência Turismo Catarinense, 2006.

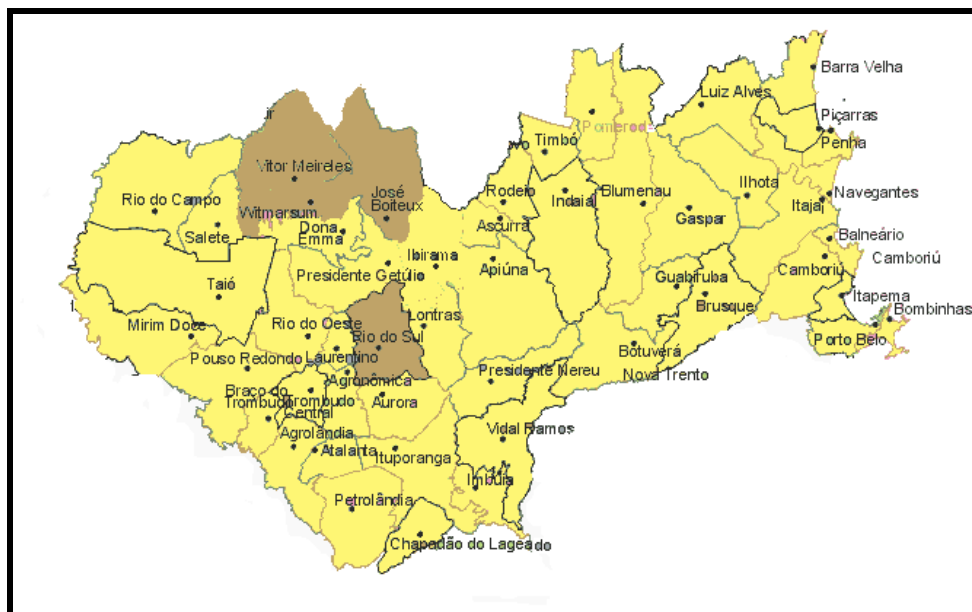


Figura 4 – Mapa da região do Alto Vale do Itajaí. Em marrom, municípios onde foi diagnosticado intoxicação espontânea por *S. carpinifolia*

Fonte: Agência Turismo Catarinense, 2006.

### 3.4 EUTANÁSIA

Para necropsia dos animais espontaneamente e experimentalmente intoxicados, foi realizado procedimento analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UEDESC), baseado na Resolução Nº. 714 de 20 de Junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, como segue:

- 1- Tranquilização com acepromazina (ACEPRAN<sup>®</sup> 1%) – 0,2 mg/Kg
- 2- Relaxamento muscular com cloridrato de xilazina (Rompum<sup>®</sup> 2%) – 0,05mg/Kg
- 3- Anestesia geral com Barbitúrico – a termo

### 3.5 NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Após a eutanásia os animais foram necropsiados e coletou-se amostras de fígado, rim, linfonodos, baço, rúmen, retículo, omaso, abomaso, segmentos intestinais, adrenal, pâncreas, pulmão, coração, músculo esquelético, aparelho reprodutor e gânglio trigêmeo. O encéfalo e medula espinhal foram coletados inteiros. As amostras coletadas foram fixadas em formalina tamponada 10%. Fragmentos do cerebelo, pâncreas e tireóide dos bovinos 6, 10 e 11 foram coletadas para microscopia eletrônica em glutaraldeído 2% tamponado em cacodilato de sódio.

### 3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

#### 3.6.1 Microscopia óptica

As amostras coletadas foram fixadas por 72 horas. Do encéfalo, foram feitos cortes transversais de cinco regiões (Figura 5). A medula foi cortada transversalmente sobre a intumescência cervical e lombar.

As amostras foram desidratadas em álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Secções de três micrômetros de espessura foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina, HE, (PROPHET et al., 1992).

#### 3.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram refixadas em tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em soluções crescentes de etanol e incluídas em Epon. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.



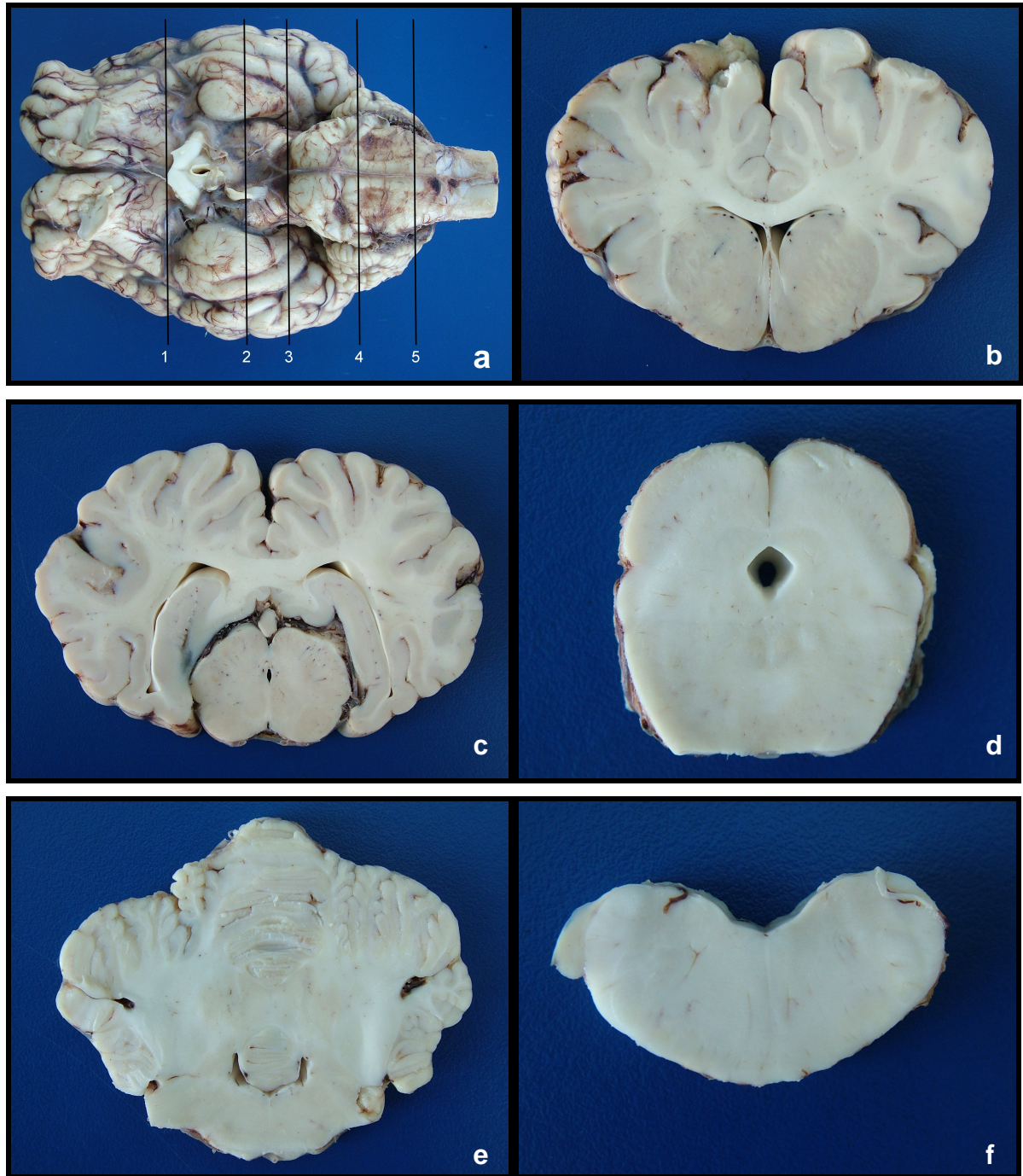


Figura 5 – Regiões analisadas do SNC (COLODEL, 2005). **a.** Regiões do SNC onde foram realizados cortes para estudar a doença. **b.** Região 1, corte transversal do córtex cerebral rostralmente ao quiasma óptico. **c.** Região 2, corte transversal do córtex cerebral e tálamo caudal ao corpo mamilar. **d.** Região 3, mesencéfalo cortado transversalmente sobre a fossa interpeduncular. **e.** Região 4, corte transversal do cerebelo e ponte sobre o pedúnculo cerebelar. **f.** Região 5, corte transversal do bulbo sobre o óbex.

## 4. RESULTADOS OBTIDOS

### 4.1 INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA

#### 4.1.1 Epidemiologia, sinais clínicos e lesões macroscópicas

A doença foi observada em seis propriedades de quatro municípios localizados na região do Alto Vale do Itajaí-SC. Dados sobre os surtos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados epidemiológicos dos surtos onde ocorreu intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* em bovinos.

Surto	Descrição da propriedade
1	Propriedade com 15 bovinos. Em 10 anos morreram, com sinais clínicos semelhantes, 36 animais. Clinicamente foram avaliadas 5 novilhas, sendo que 3 delas foram eutanasiadas e necropsiadas. Todos os animais afetados pastoreavam em piquetes com pastagem escassa e invadidos por <i>S. carpinifolia</i> .
2	Um bovino com sinais clínicos acentuados era mantido em uma pequena área com grande quantidade de <i>S. carpinifolia</i> e após foi confinado em galpão, recebendo alimentação no cocho por aproximadamente 90 dias. Posteriormente, foi enviado ao Laboratório de Patologia Animal, permanecendo por mais 30 dias, quando foi sacrificado.
3	Um lote de 84 bovinos foi colocado durante um período de seca em uma área invadida por <i>S. carpinifolia</i> . Nove meses após apareceram os primeiros casos da doença. Adoeceram 76 animais. Estes foram transferidos para outra área livre de <i>S. carpinifolia</i> . Os sinais clínicos suavizaram, porém todos tinham subdesenvolvimento. Foram examinados 5 animais doentes e realizado eutanásia e necropsia de uma novilha.
4	Propriedade com 12 bovinos, dos quais um estava clinicamente doente e foi eutanasiado para necropsia após o animal ter caído em uma vala e não conseguir mais se levantar. Todos os piquetes em que ficavam os animais estavam invadidos por <i>S. carpinifolia</i> (Figura 6a).
5	Nessa propriedade havia 40 bovinos em uma pastagem com grande quantidade de <i>S. carpinifolia</i> . Três animais estavam doentes, dos quais um foi eutanasiado e necropsiado e o sistema nervoso de outro animal com os mesmos sinais clínicos foi enviado ao Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC pelo proprietário.
6	Propriedade com 16 bovinos, adoeceu um animal. O bovino clinicamente afetado ficou em piquete invadido por <i>S. carpinifolia</i> por um mês. Foi retirado do piquete e abatido pelo proprietário cinco meses depois, o SNC foi coletado para exame histológico.

Foi observada morbidade de até 90% (surto3). A mortalidade foi baixa e ocorreria, de modo geral após acidentes. O bovino 6 foi eutanasiado após cair em uma vala e não conseguir mais se levantar e o bovino 8 foi eutanasiado após permanecer por 2 dias em decúbito sem conseguir se levantar.

A doença ocorreu de modo geral em pequenas propriedades, onde *S. carpinifolia* invadia os piquetes e em algumas ocasiões era a vegetação predominante (Figura 6a e 6b). Os proprietários dos animais espontaneamente intoxicados relataram que após algum tempo consumindo *S. carpinifolia*, os animais desenvolvem apetite pela planta vindo a consumi-la mesmo com outros alimentos à disposição.

Os principais sinais neurológicos observados nos casos de intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* consistiam de olhar atento com movimentos freqüentes de orelhas, balanço contínuo de cabeça e pescoço, incoordenação motora com andar cambaleante com hipermetria, quedas freqüentes e, quando em estação ficavam em posição de base larga (Figura 6c). Nos casos mais graves, os animais deitavam com freqüência e tinham dificuldade em levantar. Ao HR test os animais exacerbavam os sinais clínicos e os mais gravemente afetados apresentavam quedas ao solo.

Os bovinos 3, 2, 4 e 9 apresentaram sinais clínicos neurológicos discretos, leves, moderados e severos, respectivamente, porém após ficarem sem consumir a planta por um período de 90, 90, 120 e 150 dias, respectivamente, os sinais clínicos suavizaram, mas os animais continuaram com baixa estatura, contudo voltaram a ganhar peso.

Dos 16 animais doentes e avaliados clinicamente apenas um bovino (Bovino 8) tinha desenvolvimento esquelético normal. Todos os demais animais doentes eram magros e apresentavam subdesenvolvimento corporal caracterizado por baixa estatura e tamanho da cabeça desproporcional em relação ao corpo do animal (Figura 6d) tinham dentição frouxa e deformação da gengiva (Figura 6e e 6f).

Os proprietários relatavam ainda que com frequência os animais doentes manifestavam diarreia intermitente.





Figura 6 – Intoxicação natural por *Sida carpinifolia*. **a.** Piquete com grande quantidade de *S. carpinifolia* onde ocorreu o surto 4. **b.** Detalhe de **a.** **c.** Bovino 2. Subdesenvolvimento e posição de base larga. **d.** Bovino 5. Subdesenvolvimento, tamanho da cabeça desproporcional ao corpo e posição de base larga. **e.** e **f.** Bovino 1 e 6, respectivamente. malformação dos dentes e gengiva.

#### 4.1.2 Exame Histológico

A principal lesão microscópica consistiu de graus variados de vacuolização finamente granular no citoplasma de neurônios do sistema nervoso central e periférico, células foliculares da tireóide e células acinares pancreáticas. Essa vacuolização conferia à célula aspecto espumoso e tumefeito.

Os principais neurônios afetados foram os neurônios de Purkinje do cerebelo e com menor intensidade também os neurônios das outras regiões do sistema nervoso central que compreendiam: núcleo caudado, núcleo basal, cápsulas interna e externa, córtex do encéfalo, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, bulbo e medula espinhal. No sistema nervoso periférico foram observadas vacuolizações em neurônios do gânglio trigeminal e plexos mioentéricos.

Os bovinos 2, 3, 4 e 9 foram retirados das áreas contaminadas pela planta, por um período de 90, 90, 120 e 150 dias, respectivamente. Nesses, os neurônios de Purkinje não estavam vacuolizados, porém, haviam grupos de neurônios encarquilhados apresentando núcleos picnóticos com citoplasma eosinofílico e bordos citoplasmáticos irregulares (Figura 7a). Em algumas áreas do cerebelo verificou-se rarefação de neurônios de Purkinje e proliferação de células gliais de Bergman (Figura 7b). Esferóides axonais foram visualizados na camada de células granulares do cerebelo e bulbo (Figura 7c e 7d), sendo mais freqüentes nos bovinos 2, 3 e 4. Adicionalmente, no mesencéfalo dos bovinos 2 e 3 havia infiltrado de macrófagos de intensidade leve na periferia de vasos.

Os bovinos 1, 5, 6, 7 e 8 apresentaram sinais clínicos moderados a acentuados e foram eutanasiados nessa fase. Os bovinos 1 e 5 apresentavam vacuolização moderada a acentuada em alguns neurônios de Purkinje (Figura 7e), e vacuolização leve em neurônios da camada de células granulares no cerebelo e do corno ventral da medula espinhal. Vacuolização acentuada foi verificada em células acinares pancreáticas e macrófagos reticulares de órgãos linfóides. Grupos de neurônios encarquilhados e esferóides axonais foi um achado freqüente, porém, estes eram mais comumente visualizados na camada de células granulares do cerebelo e bulbo. Na camada molecular do cerebelo observou-se a formação de vacúolos, às vezes com conteúdo finamente granular. Nos bovinos 6, 7 e 8 as lesões eram semelhantes, porém de intensidade mais acentuada (Figura 7f, 8a, 8b, 8c e 8d). Nesses três últimos animais, adicionalmente havia vacuolização em epitélio dos ductos coletores das glândulas salivares (Figura 8e), vacuolização leve em neurônios de plexos mioentéricos (Figura 8f), neurônios do gânglio trigeminal (Figura 9a e 9b) e vacuolização moderada a acentuada em neurônios de núcleos do bulbo (Figura 9c e 9d) e em células foliculares da tireóide (Figura 9e e 9f).



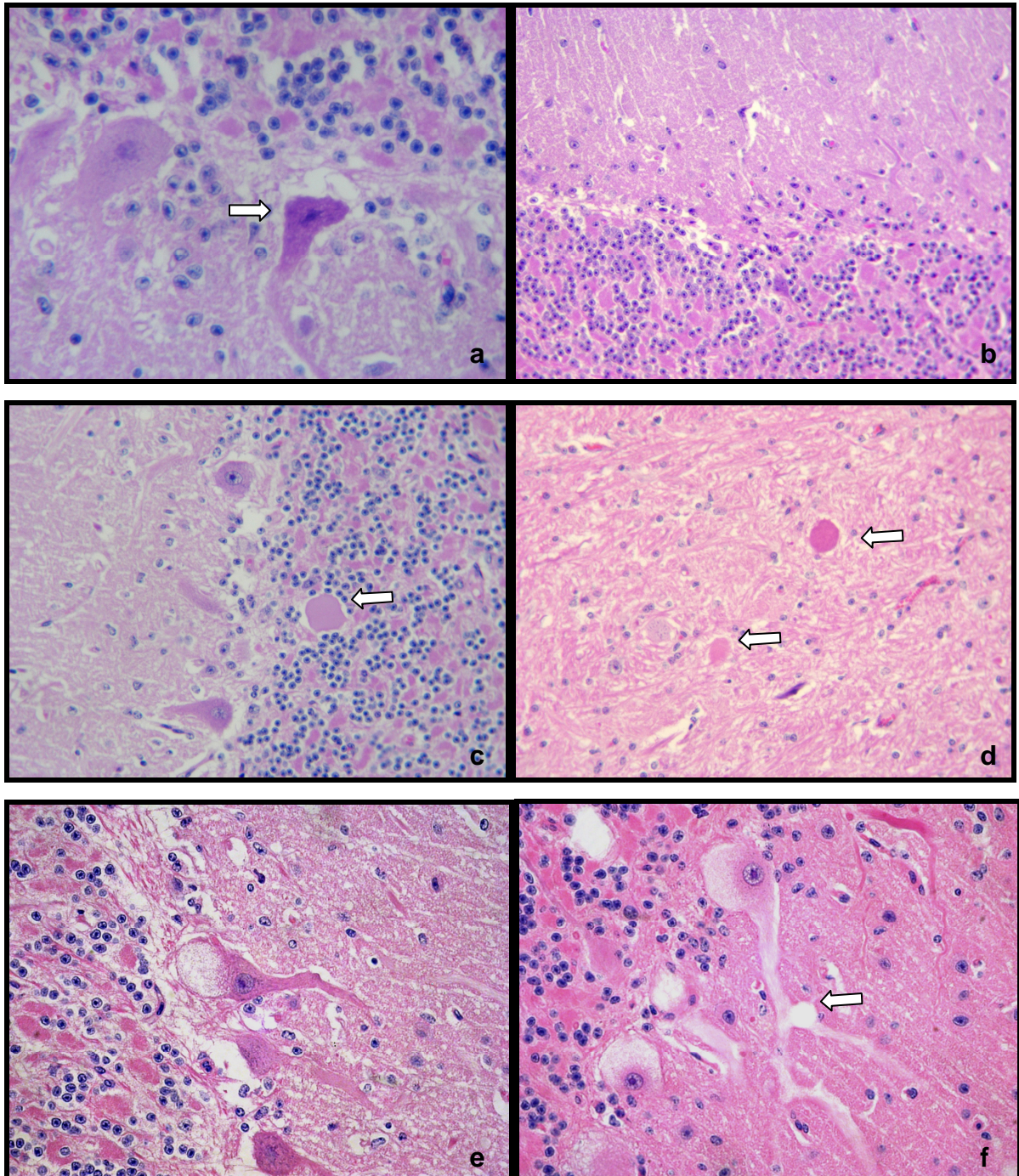


Figura 7 - Intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* (HE). **a.** Bovino 4. Neurônio encarquilhado com núcleo picnótico, citoplasma eosinofílico e bordos citoplasmáticos irregulares (seta) (objetiva 40x). Cerebelo. **b.** Bovino 2. Cerebelo. Área com rarefação de neurônios de Purkinje e proliferação de células gliais de Bergman (objetiva 20x). **c.** Bovino 9. Esferóide axonal na camada de células granulares do cerebelo (seta) (objetiva 20x). **d.** Bovino 4. Bulbo. Esferóide axonais (setas) (objetiva 20x). **e.** Bovino 5. Cerebelo. Vacuolização em neurônio de Purkinje (objetiva 40x). **f.** Bovino 6. Cerebelo. Vacuolização em neurônio de Purkinje com tumefação e vacuolização axonal (seta) (objetiva 40x).



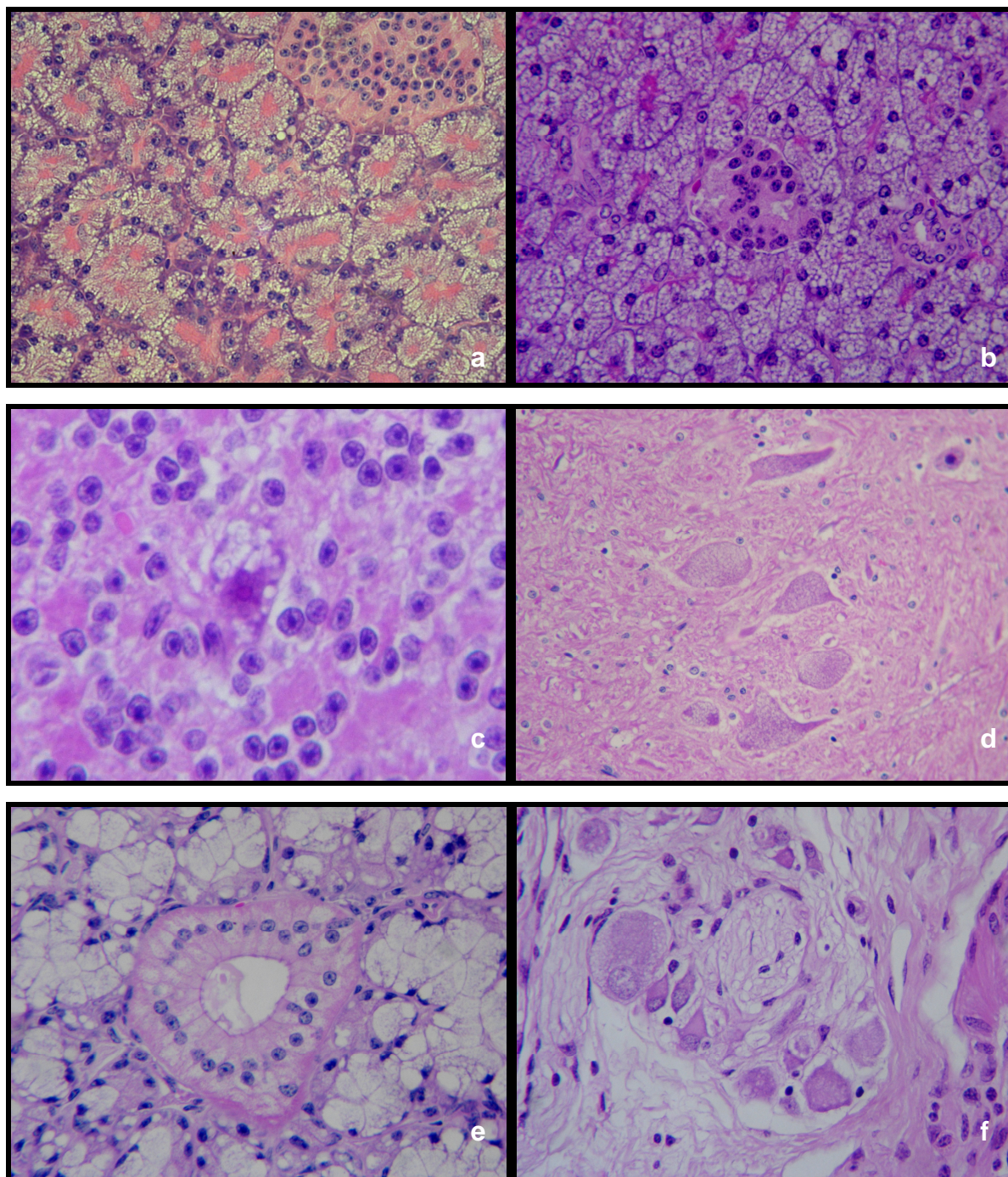


Figura 8 – Intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* (HE). **a.** e **b.** Bovinos 6 e 8, respectivamente. Vacuolização em células acinares pancreáticas (objetiva 40x). **c.** Bovino 6. Vacuolização em neurônio da camada de células granulares do cerebelo (objetiva 40x). **d.** Bovino 6. Neurônios do ramo ventral da medula espinhal vacuolizados (objetiva 20x). **e.** Bovino 6. Vacuolização de células do epitélio da glândula salivar (objetiva 20x). **f.** Bovino 8. Vacuolização de neurônios do plexo mioentérico (objetiva 40x).



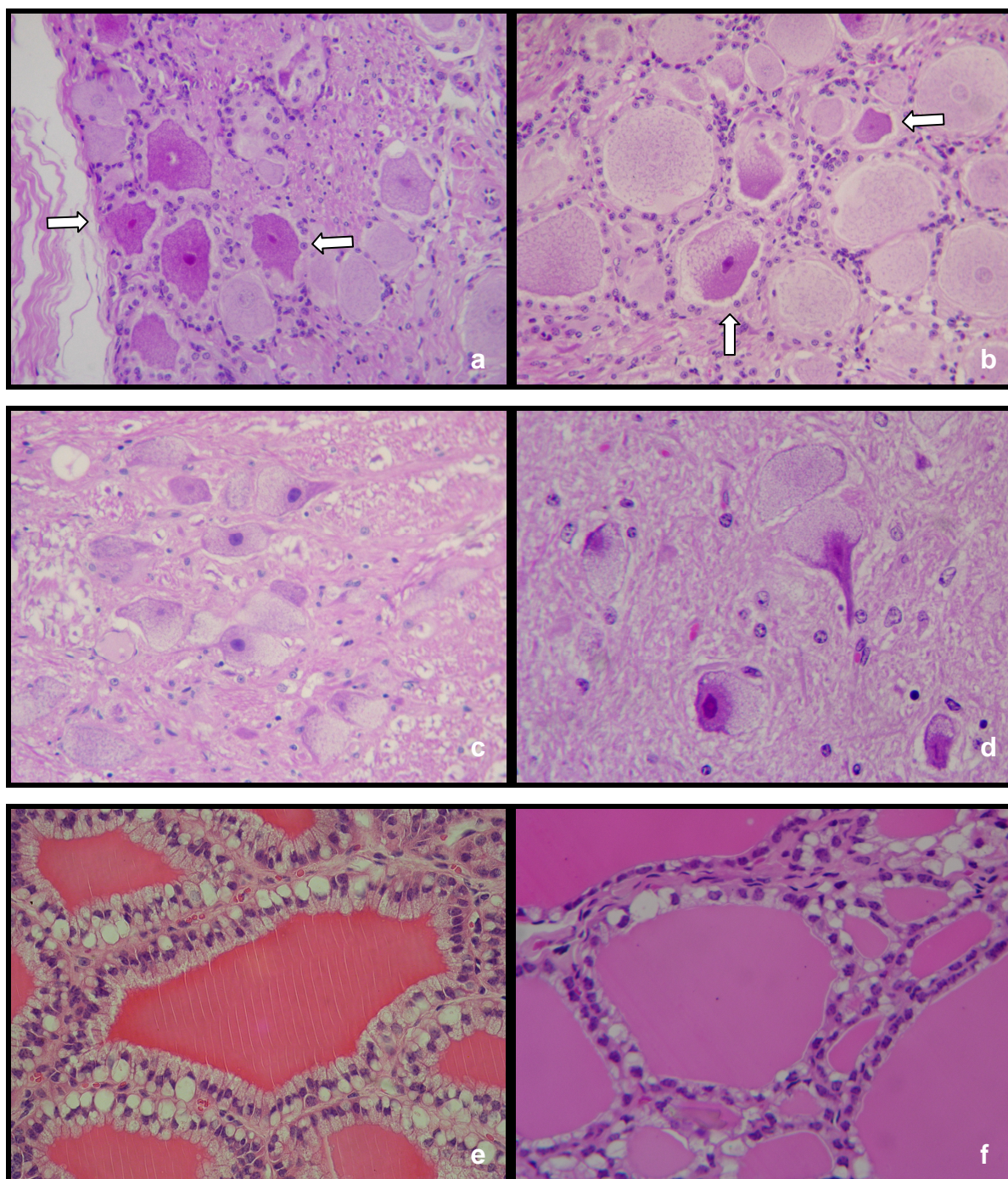


Figura 9 – Intoxicação espontânea por *S. carpinifolia* (HE). Todas as fotos são dos bovinos 6 e 8 respectivamente. **a. e b.** Neurônios encarquilhados (setas) (objetiva 10x) e vacuolização e encarquilhamento (setas) (objetiva 20x) em neurônios do gânglio trigeminal. **c. e d.** Vacuolização em neurônios de núcleos do bulbo (objetiva 20x e objetiva 40x). **e. e f.** Vacuolização em células foliculares da tireóide (objetiva 40x).



## 4.2 INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL

### 4.2.1 Sinais clínicos e lesões macroscópicas.

Os animais desenvolveram, ao final da primeira semana de experimento apetite pela planta, vindo a consumi-la mesmo logo após retornarem do período de pastejo (Figura 10a).

Todos os animais apresentaram alteração na consistência das fezes caracterizada por fezes pastosas, raramente líquidas com apresentação em períodos intermitentes e curso clínico de 24 a 48 horas. Excepcionalmente, os bovinos 13 e 14 apresentaram no final do primeiro mês de experimentação fezes escassas e com muco.

Com excessão do bovino número 10, todos os outros animais não tiveram ganho de peso ou apresentaram emagrecimento (Tabela 4).

Tabela 4 – Variação de peso médio/dia de bovinos experimentalmente intoxicados com *S. carpinifolia*.

Bovino	Dose diária g/kg	Período (dias)	Peso inicial (Kg)	Peso final (Kg)	Variação de peso médio/dia (g)
10	10	120	269	300	250
11	20	120	250	250	0
12	40	30	101	100	0
13	30	150	221	200	-140
14	40	150	145	135	- 60

Os sinais clínicos iniciaram-se a partir da 3ª e 4ª semana de experimentação e consistiam de olhar atento com orelhas voltadas para trás, movimentação lenta, andar em “marcha” com passos curtos e pescoço esticado para frente e para baixo.

O quadro clínico classificado como leve teve início precocemente no bovino 11 (20g/Kg), ocorrendo durante a 4ª semana de experimento e tardiamente no bovino 13 (30g/Kg), durante a 8ª semana de experimentação. Além desses sinais havia ainda distúrbios de propriocepção (Figura 10b, 10c, 10d e 10e), andar cambaleante e às vezes tropeções. Os animais apresentavam também hiperexcitação, assustando-se facilmente com qualquer barulho ou toque e tinham medo de sair da baía ou passar por canaletas.

Os sinais clínicos considerados moderados foram observados apenas nos bovinos 13 (30g/Kg) e 14 (40g/Kg) aos 99 e 77 dias de experimentação respectivamente e consistiam de aumento dos cambaleios com tropeções mais freqüentes e às vezes quedas. Havia dificuldades de transpor obstáculos como subir e descer calçadas. Quando submetidos a estresse os animais às vezes apresentavam tremores leves de cabeça e pescoço.

O único animal a apresentar sinais clínicos severos foi o bovino 14 aos 150 dias de experimentação. Esses sinais consistiam de tropeções e quedas freqüentes, incoordenação motora com andar cambaleante com hipermetria, além de tremores constantes de cabeça e pescoço.

Ao HR test e quando movimentados, os animais tinham os sinais clínicos mais caracterizados. O bovino 14 ao final do período de experimentação apresentava quedas quando submetido a esse teste (Figura 10f).

O bovino 12 foi encontrado morto na manhã do 30º dia após o início do experimento.

Os sinais clínicos variaram entre os animais de acordo com o período de consumo da planta e da dose diária consumida. Esses dados estão resumidos na Tabela 5. Na necropsia não foram observadas alterações macroscópicas em nenhum dos animais.

Tabela 5 – Tempo de consumo de planta para início das alterações neurológicas e intensidade dos sinais clínicos relacionados à dose diária de planta em bovinos experimentalmente intoxicados com *S. carpinifolia*.

Bovino	Dias consumo	Dose (g/Kg)	Início dos sinais neurológicos (dias)			
			D	L	M	A
10	120	10	24	41	-	-
11	120	20	19	27	-	-
12	30	40	-	7	-	-
13	150	30	27	58	99	-
14	150	40	27	55	77	150

D = Sinais discretos: Olhar atento, movimentação lenta, andar em “marcha”.

L = Sinais leves: Além dos sinais discretos apresenta ainda cambaleios e às vezes tropeções.

M = Sinais moderados: Aumentavam os cambaleios e tropeções, às vezes apresentavam quedas e tremores leves de cabeça e pescoço.

A = Sinais acentuados: Os tropeções e quedas eram freqüentes. Tinham tremores constantes de cabeça e pescoço, incoordenação motora e hipermetria.



Figura 10 - Intoxicação experimental por *S. carpinifolia*. **a.** Bovino 14 (40g/Kg) comendo o restante da dose de *S. carpinifolia* do dia após voltar do período de pastejo. **b., c., d. e e.** Bovino 13 (30g/Kg) e 14, respectivamente. Distúrbios proprioceptivos. **F.** Bovino 14 em queda após o HR test.

#### 4.2.2 Exame Histológico

As lesões microscópicas induzidas experimentalmente foram semelhantes às encontradas nos casos de intoxicação espontânea por *S. carpinifolia*.

Nos bovinos 10 e 12 que comeram *Sida carpinifolia* nas doses de 10g/kg por 120 dias e 40g/Kg por 30 dias, respectivamente, foi observado no cerebelo vacuolização leve de neurônios de Purkinje (Figura 11a) e nos neurônios da camada de células granulares. Na camada molecular verificou-se vacúolos, às vezes com conteúdo finamente granular (Figura 11b). Vacuolização leve a moderada foi observada nas células acinares pancreáticas (Figura 11c) e células foliculares da tireóide (Figura 11d). Adicionalmente, no bovino 10 havia esferóides axonais, principalmente na região do óbex, focos de gliose no córtex do encéfalo e bulbo além de infiltrado mononuclear leve ao redor de vasos do córtex encefálico e na piamáter.

O bovino 11 que comeu 20g/Kg de *S. carpinifolia* por 120 dias apresentou lesões semelhantes aos bovinos 10 e 12, porém de intensidade moderada. Em algumas áreas notava-se rarefação de neurônios de Purkinje e proliferação de células gliais de Bergman, bem como, áreas com grupos de neurônios encarquilhados. Vacuolização leve foi observada também em neurônios do gânglio trigeminal e neurônios da medula espinhal e células foliculares da tireóide.

Nos bovinos 13 e 14 que comeram, respectivamente 30 e 40 g/Kg da planta por 150 dias as lesões eram mais acentuadas e difusas (Figura 11e, 11f e 12a). Também havia vacuolização em neurônios e esferóides no bulbo (Figura 12b e 12c) e vacuolização em neurônios da medula espinhal (Figura 12d). No córtex encefálico do bovino 13 observou-se infiltrado mononuclear leve ao redor de vasos. Adicionalmente no bovino 14 notou-se vacuolização moderada de células foliculares da tireóide (Figura 12e) e células epiteliais do epidídimo (Figura 12f). Um resumo do trabalho pode ser visto na Tabela 4.

#### 4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

No pericário de neurônios de Purkinje e citoplasma células foliculares da tireóide verificou-se, ultraestruturalmente, vacúolos delimitados por membranas, por vezes com conteúdo finamente granular (Figura 13a). Adicionalmente no citoplasma das células foliculares da tireóide notaram-se grânulos de secreção eletrodensos (Figura 13b).



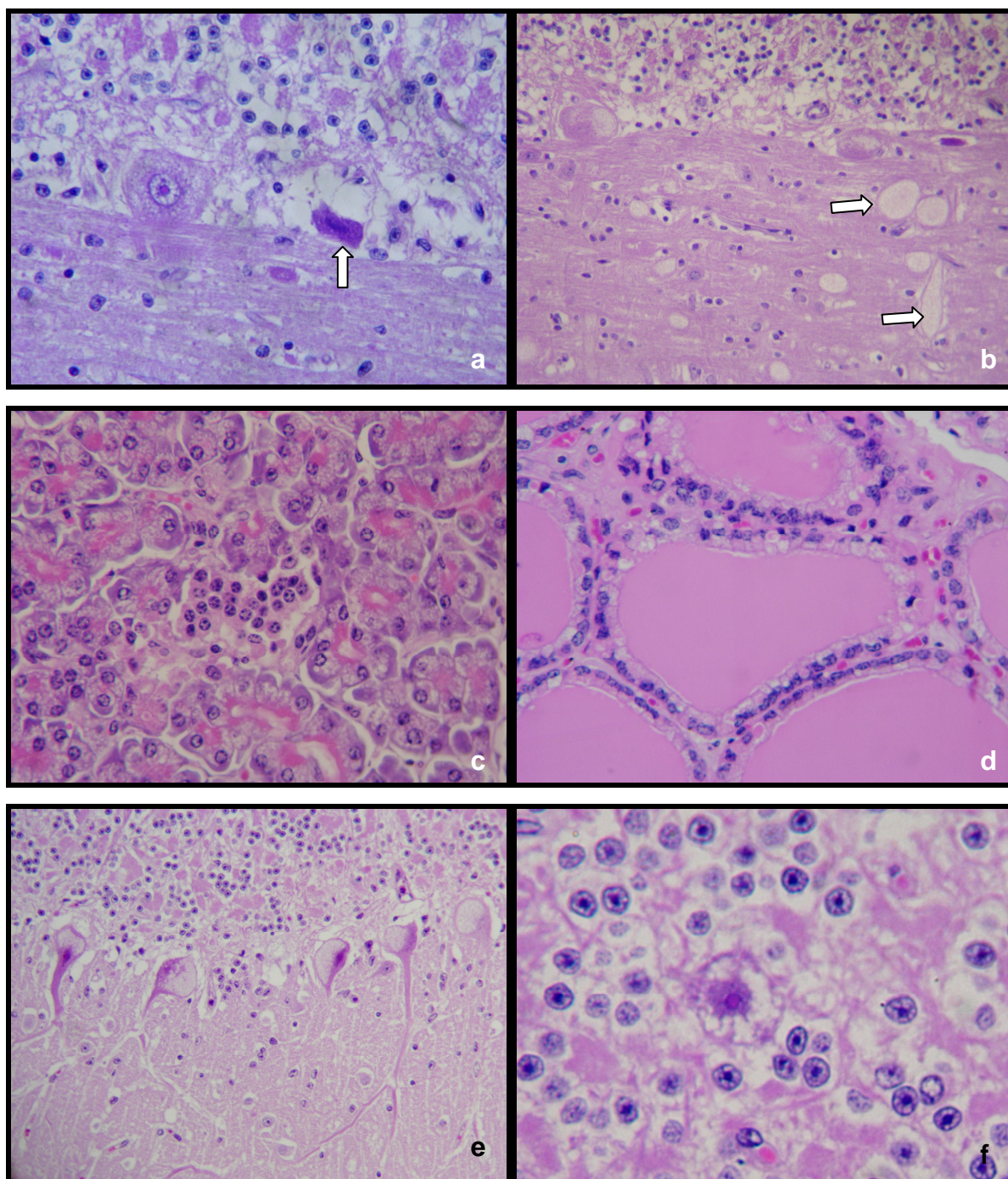


Figura 11 – Intoxicação experimental por *S. carpinifolia* (HE). **a.** Bovino 12 . Cerebelo. Vacuolização de neurônio de Purkinje, ao lado neurônio encarquilhado (seta) (objetiva 40x). **b.** Bovino 10 (10g/Kg/120 dias). Vacuolização em neurônios de Purkinje e vacúolos com conteúdo finamente granular na camada molecular do cerebelo (setas) (objetiva 20x). **c.** Bovino 12 (40g/Kg/30 dias). Vacuolização em células acinares pancreáticas (objetiva 20x). **d.** Bovino 10. Vacuolização em células foliculares da tireóide (objetiva 20x). **e.** Bovino 13. Vacuolização difusa em neurônio de Purkinje (objetiva 10x). **f.** Bovino 14 (40g/Kg/150 dias). Vacuolização em neurônio da camada de células granulares do cerebelo (objetiva 40x).



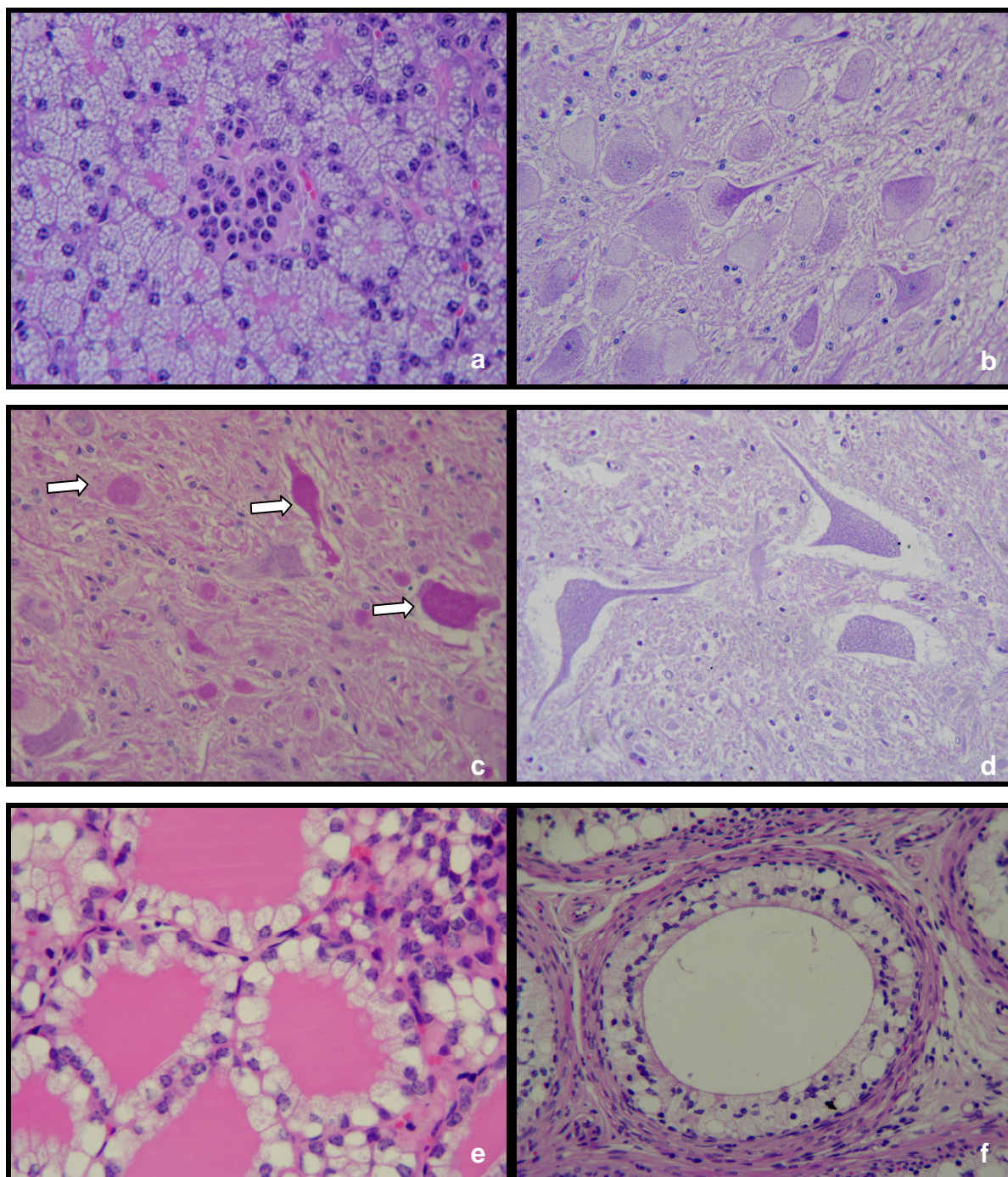


Figura 12 – Intoxicação experimental por *S. carpinifolia* (HE). **a.** Bovino 13 (30g/Kg/150 dias). Vacuolização em células acinares pancreáticas (objetiva 20x). **b.** Bovino 14 (40g/Kg/150 dias). Vacuolização em neurônios do bulbo (objetiva 20x). **c.** Bovino 13. Esferóides axonais no bulbo (setas) (objetiva 20x). **d.** Bovino 13. Vacuolização em neurônios da medula espinhal (objetiva 20x). **e. e f.** Bovino 14. Vacuolização em células foliculares da tireóide e em células epiteliais do epidídimo (objetiva 20x).

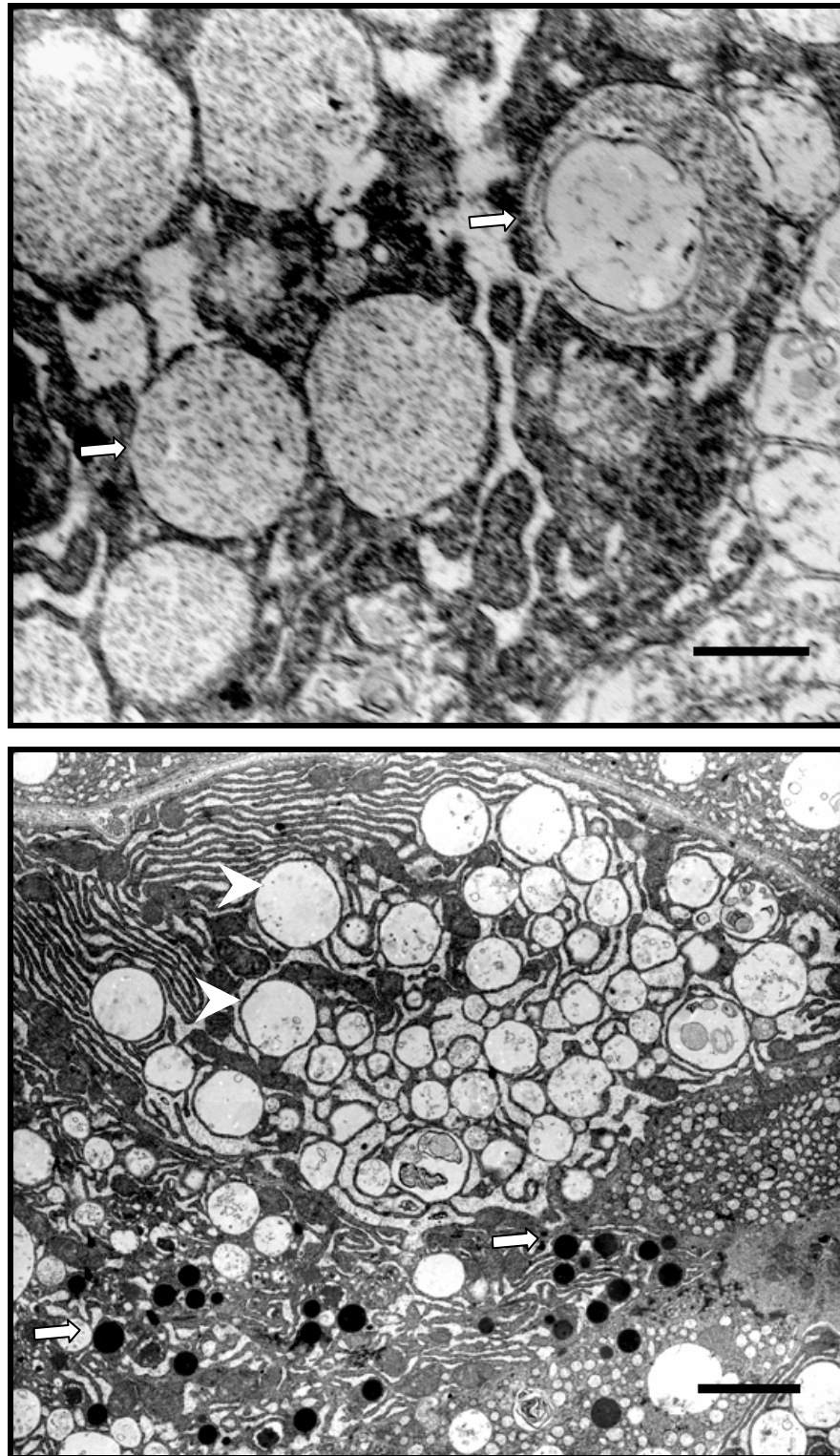


Figura 13 – Intoxicação por *S. Carpinifolia*. **a.** Pericário de neurônio de Purkinje com vacúolos delimitados por membranas, alguns contendo material finamente granular (setas) (Barra = 0,5 $\mu$ m). **b.** Citoplasma de célula folicular da tireóide com grânulos de secreção eletrodensos (setas) e vacúolos delimitados por membranas contendo material finamente granular (cabeças de setas) (Barra = 3 $\mu$ m).

Tabela 4 – Identificação, consumo diário, período de consumo, total de planta consumida, período sem consumo, intensidade dos sinais clínicos e principais lesões microscópicas observadas em bovinos espontaneamente e experimentalmente intoxicados por *S. carpinifolia*.

Bovino	Surto	Idade (meses)	Consumo g/Kg/dia	Período de consumo (dias)	Total de planta consumida (Kg)	Período sem consumo (dias) <sup>c</sup>	Sinais clínicos	Principais lesões microscópicas
1	1	36	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND	+++ <sup>d</sup>	Vacuolização moderada a acentuada em neurônios de Purkinje, células foliculares da tireóide e células acinares pancreáticas, grupos de neurônios encarquilhados e esferóides axonais, principalmente em cerebelo e bulbo.
2	1	36	ND	ND	ND	90	++	Grupos de neurônios encarquilhados associados a proliferação de células de Bergman, esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
3	1	36	ND	ND	ND	90	+	Grupos de neurônios encarquilhados associados a proliferação de células de Bergman, esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
4	2	48	ND	ND	ND	120	+++	Grupos de neurônios encarquilhados associados a proliferação de células de Bergman, esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
5	3	36	ND	ND	ND	ND	+++	Vacuolização moderada a acentuada em neurônios de Purkinje, células foliculares da tireóide e células acinares pancreáticas, grupos de neurônios encarquilhados e esferóides axonais, principalmente em cerebelo e bulbo.
6	4	36	ND	ND	ND	ND	++++	Vacuolização intensa e difusa em neurônios de Purkinje, células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados e proliferação de células de Bergman. Esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
7	5	24	ND	ND	ND	ND	ND	Vacuolização intensa e difusa em neurônios de Purkinje, células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados e proliferação de células de Bergman. Esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
8	5	24	ND	ND	ND	ND	++++	Vacuolização intensa e difusa em neurônios de Purkinje, células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados e proliferação de células de Bergman. Esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
9	6	48	ND	ND	ND	150	++++	Grupos de neurônios encarquilhados associados a proliferação de células de Bergman, esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
10	Exp. <sup>a</sup>	24	10	120	335	ND	++	Vacuolização leve em neurônios de Purkinje e moderada em células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados e esferóides em cerebelo e bulbo.
11	Exp.	18	20	120	585	ND	++	Vacuolização moderada em neurônios de Purkinje, células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados com proliferação de células de Bergman e esferóides axonais em cerebelo e bulbo.
12	Exp.	16	40	30	110	ND	++	Vacuolização leve em neurônios de Purkinje e moderada em células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados e esferóides em cerebelo e bulbo.
13	Exp.	24	30	150	965	ND	+++	Vacuolização acentuada difusa em neurônios de Purkinje e células acinares pancreáticas e vacuolização moderada em células foliculares da tireóide, grande frequência de grupos de neurônios encarquilhados e esferóides em cerebelo e bulbo.
14	Exp.	18	40	150	850	ND	++++	Vacuolização acentuada difusa em neurônios de Purkinje e células acinares pancreáticas e vacuolização moderada em células foliculares da tireóide, grupos de neurônios encarquilhados e esferóides em cerebelo e bulbo.

a – Animais experimentais.

b – Não disponível.

c – Período que os animais ficaram sem consumir a planta antes de serem eutanasiados.

d – ++++ Acentuados, +++ Moderados, ++ Leves, + Discretos.



## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi caracterizado a epidemiologia, sinais clínicos, lesões microscópicas e ultra-estruturais da intoxicação natural e experimental por *S. carpinifolia* em bovinos.

A doença foi observada em pequenas propriedades onde a bovinocultura não era a atividade principal. Nessas propriedades, *S. carpinifolia* invadia os piquetes e em algumas ocasiões era a vegetação predominante. Em todas as propriedades em que ocorreram casos espontâneos de intoxicação por *S. carpinifolia* a fome levou os bovinos ao consumo da planta. Outro fator importante foi o grau de invasão da pastagem por *S. carpinifolia*. Em algumas propriedades era praticamente impossível o animal apreender outro alimento sem consumir junto a planta. Colodel et al. (2002a) relatam que caprinos intoxicados adquirem avidez para pastorear *S. carpinifolia*, mesmo tendo outros alimentos à disposição. Esse comportamento foi observado também em bovinos tanto nos casos de intoxicação espontânea como experimental.

Alterações na consistência das fezes foram relatadas por proprietários de animais espontaneamente intoxicados. Embora não tenha relatado alterações neurológicas em bovinos, Colodel (2005) faz referência a proprietários que mencionaram a ocorrência de diarreia em bovinos logo nos primeiros dias após os animais serem colocados em piquetes invadidos por *S. carpinifolia*. No estudo da intoxicação experimental por essa planta em bovinos foi verificado fezes pastosas com curso de 24 a 48 horas. Alterações semelhantes foram verificadas também em caprinos e ovinos experimentalmente intoxicados por essa planta (COLODEL, 2005; SEITZ et al., 2005).

Perda de peso em bovinos, ovinos e eqüinos tem sido relatada na intoxicação por *locoweeds* (JAMES et al., 1981) e por *S. carpinifolia* em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005) e bovinos (FURLAN et al., 2005). Nos casos de intoxicação espontânea observados no presente estudo, emagrecimento e subdesenvolvimento foram achados freqüentes. Na reprodução

experimental da doença houve perda de peso em três bovinos e em dois não houve ganho de peso.

As principais alterações neurológicas observadas tanto nos casos de intoxicação espontânea como na doença experimental refletiam principalmente as alterações cerebelares. Os animais apresentavam incoordenação motora, dismetria, tremores de cabeça e pescoço, desequilíbrio, quedas, dificuldade para levantar e voltar à estação. Essas alterações foram relacionadas com a intensidade dos sinais clínicos, com o tempo de consumo e quantidade de *S. carpinifolia* ingerida, bem como, com a intensidade da vacuolização e distensão do citoplasma, principalmente dos neurônios de Purkinje.

O cerebelo funciona como regulador e não como iniciador da atividade motora (DE LAHUNTA, 1983). Sua função é coordenar e precionar os movimentos induzidos pelo neurônio motor em relação à postura para providenciar sinergismo da atividade muscular. O cerebelo também funciona na manutenção do equilíbrio e na regulação do tônus para preservar a posição normal do corpo quando em repouso ou durante o movimento. Os núcleos cerebelares que continuamente auxiliam os neurônios motores do tronco encefálico, são por sua vez regulados pela função inibitória dos neurônios de Purkinje do córtex cerebelar. Uma inibição inadequada dos núcleos cerebelares por parte dos neurônios de Purkinje resulta no retardamento da inibição do movimento voluntário, e então ocorre uma resposta hipermétrica. Envolvimento de outras áreas cerebelares pode ainda causar distúrbios do sistema vestibular levando à perda de equilíbrio, posturas bizarras, marcha cambaleante com passos largos e movimentos espasmóticos com tendência a quedas. Portanto, doenças afetando o cerebelo não causam a perda de uma simples função, mas uma resposta motora inadequada e generalizada.

Os sinais clínicos neurológicos observados, tanto nos casos espontâneos de intoxicação como na reprodução experimental estão em acordo com os descritos em casos de intoxicação por *S. carpinifolia* em bovinos (FURLAN et al., 2005), caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005; GODOY et al., 2005) e ovinos (SEITZ et al., 2005). Por outro lado, pôneis espontaneamente intoxicados por *S. carpinifolia* mostraram sinais clínicos predominantemente associados à cólica (LORETTI et al., 2003a).

O início dos sinais neurológicos observados na reprodução experimental da doença em bovinos foi mais tardio quando comparados aos descritos em ovinos

(SEITZ et al., 2005) e em caprinos (COLODEL, 2005), que usaram *S. carpinifolia* dessecada. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que nos bovinos foi utilizado a planta *in natura*. Driemeier et al. (2000) e Colodel et al. (2002a) também relatam sinais clínicos mais precoces em caprinos que consumiram *S. carpinifolia* seca e mais tardios nos que ingeriram a planta *in natura*.

Os bovinos 2, 3, 4 e 9 apresentaram sinais clínicos neurológicos moderados ou acentuados. Porém, após ficarem 90, 90, 120 e 150 dias, respectivamente sem consumir a planta, os sinais clínicos atenuaram. Os animais continuaram com baixa estatura e subdesenvolvimento, porém voltaram a ganhar peso. Caprinos e ovinos intoxicados com *S. carpinifolia* também tiveram atenuação do quadro clínico após suspensão do consumo da planta (COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005; GODOY et al., 2005; SEITZ et al., 2005).

Apesar da recuperação clínica parcial ou total, esses animais apresentavam lesões histológicas residuais caracterizadas por neurônios encarquilhados associados a áreas com rarefação de neurônios de Purkinje e proliferação de células gliais de Bergman no cerebelo. Por vezes esferóides axonais eram visualizados na camada de células granulares do cerebelo e bulbo. Lesões residuais são descritas também em caprinos (COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005) e ovinos (SEITZ et al., 2005) que apresentavam sinais clínicos neurológicos e foram necropsiados após permanecerem por longos períodos sem consumir *S. carpinifolia*. A atenuação do quadro clínico neurológico pode ser explicado pela uniformidade histológica e funcional do córtex cerebelar. Em casos de lesões cerebelares, as áreas normais assumem progressivamente as funções das áreas em que ocorreu morte celular. Isso não ocorre se a lesão comprometer os núcleos cerebelares (MACHADO, 1999). Desse modo, a retirada dos animais de áreas invadidas por *S. carpinifolia* antes que esses estejam gravemente afetados pela doença pode ser um manejo profilático eficiente.

Vacuolização finamente granular difusa conferindo ao citoplasma um aspecto espumoso associado ou não à tumefação celular verificado principalmente em neurônios, células acinares pancreáticas e células foliculares da tireóide, foi o achado microscópico mais freqüente. Essas alterações corroboram as descrições feitas para bovinos (FURLAN et al., 2005), caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005), ovinos (SEITZ et al., 2005) e pôneis (LORETTI et al., 2003a) intoxicados com *S. carpinifolia*. Lesões semelhantes são

descritas também em casos de intoxicações por outras plantas que contém o alcalóide swainsonina (JAMES et al., 1981; DORLING et al., 1978; BALOGH et al., 1999; DANTAS et al., 2006; BARBOSA et al., 2006), em casos de alfa-manosidose hereditária bovina (WHITTEM e WALKER, 1957; JOLLY e THOMPSON, 1978), humana (OCKERMAN, 1967), de felinos domésticos (BURDITT et al., 1980; MAENHOUT et al., 1988) e de cobaias (MUNTZ et al., 1999). Na alfa-manosidose adquirida, o alcalóide swainsonina inibe a alfa manosidase lisossômica (DORLING et al., 1980; ELBEIN et al., 1981; CHOTAI et al., 1983), resultando no acúmulo e excreção de oligossacarídeos parcialmente degradados, assim como ocorre na forma hereditária da doença, porém swainsonina inibe também a alfa manosidase II do aparelho de Golgi modificando a síntese e excreção de glicoproteínas (TULSIANI et al., 1982; TULSIANI e TOUSTER, 1983). Dessa forma, a atividade enzimática e excreção de oligossacarídeos diferem entre a doença adquirida e hereditária (FUHRMANN et al., 1985).

Neurônios encarquilhados caracterizados por núcleos picnóticos com citoplasma eosinofílico e bordos citoplasmáticos irregulares foram achados freqüentes nos bovinos que estavam gravemente doentes. Neurônios com características semelhantes foram observados também na intoxicação por *S. carpinifolia* em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; COLODEL, 2005) e ovinos (SEITZ et al., 2005).

Infiltrado perivascular foi observado nos bovinos 2, 3, 10 e 13. Gavier-Widen et al. (2001), examinando cérebros de 506 bovinos de sete anos de idade, clinicamente normais, concluíram que infiltrados inflamatórios ao redor de vasos sanguíneos ocorrem em 30% dos animais em diversas regiões do cérebro e podem estar associados a infecções subclínicas ou latentes.

Os vacúolos contendo material finamente granular verificados na camada molecular do cerebelo de bovinos espontaneamente e experimentalmente intoxicados por *S. carpinifolia* podem ser atribuídos à formação de vacúolos em axônios de neurônios com vacuolização acentuada ou encarquilhados.

Ultra-estruturalmente, os achados corroboram com as observações de Driemeier et al. (2000) para caprinos e Seitz et al. (2005), para ovinos. Na maioria das vezes os lisossomas estavam vazios, por vezes com conteúdo finamente granular. Os vacúolos de depósito lisossomal estão geralmente vazios na alfa manosidose devido à solubilidade do material depositado que geralmente se dilui

durante o processamento das amostras (JOLLY e THOMPSON, 1978; SUMMERS et al., 1994).

Para intoxicação por *S. carpinifolia* é necessário fazer o diagnóstico diferencial de intoxicação por outras plantas que cursam com sinais clínicos nervosos. Atenção especial deve ser dada às doenças nervosas que têm apresentação clínica tremogênica e/ou causam vacuolização neuronal. Além da caracterização dos sinais clínicos e das lesões microscópicas, torna-se necessário a obtenção dos dados epidemiológicos e a presença da planta no local. A intoxicação por *Turbina cordata*, *Ipomoea carnea*, *I. sericophylla* e *I. riedelii* afetam principalmente caprinos e ovinos e ocorrem com maior frequência no nordeste (TOKARNIA et al., 2000; BARBOSA et al., 2006; DANTAS et al., 2006; BARROS et al., 2006), porém recentemente reconheceu-se um surto de intoxicação por *I. carnea* afetando bovinos em Mato Grosso (COLODEL, 2006). *I. asarifolia* e *Phalaris angusta* causam síndrome tremogênica em ruminantes. A primeira ocorre predominantemente no nordeste e região amazônica e histologicamente não são observadas lesões (TOKARNIA et al., 2000). A intoxicação por *P. angusta* causa convulsões frequentes, na macroscopia observa-se coloração cinza-esverdeada no tronco encefálico e microscopicamente, às vezes é observado pigmento granular marrom no citoplasma de neurônios (GAVA et al., 1999; SOUSA e IRIGOYEN, 1999). Doença tremogênica, com ataques epileptiformes ocorre também na intoxicação por *Claviceps paspali* e *Solanum fastigiatum*. *C. paspali* parasita as inflorescências das gramíneas *Paspalum dilatatum* (capim melador) e *P. notatum* (grama forquilha). A intoxicação ocorre quando a gramínea é consumida contendo o fungo na fase de escleródio. Os sinais clínicos consistem de tremores, hiperexcitabilidade, hipermetria e quedas. Diferentemente da intoxicação por *S. carpinifolia*, não são observadas lesões microscópicas (RIET-CORREA et al., 1983b; TOKARNIA et al., 2000; BARROS et al., 2006). A intoxicação por *S. fastigiatum* var *Fastigiatum* é a principal doença a ser considerada para o diagnóstico diferencial no sul do Brasil. Os sinais clínicos e a lesão histológica são muito semelhantes às causadas pela intoxicação por *S. carpinifolia*, porém, clinicamente as crises convulsivas são mais comuns na intoxicação por *S. fastigiatum* (BARROS et al., 1987; RIET-CORREA et al., 1983a). Microscopicamente, a diferenciação pode ser feita utilizando-se a técnica de histoquímica com lectinas, através da qual a intoxicação por *S. carpinifolia* é caracterizada como uma alfa-manosidose

(DRIEMEIER et al., 2000) e a intoxicação por *S. fastigiatum* como uma glicolipidose (PAULOVICK et al., 2002).

A intoxicação por toxinas produzidas pelo fungo saprófita *Aspergillus clavatus* em bovinos também produz alterações no sistema nervoso. Clinicamente os animais manifestam tremores musculares, dificuldade no andar, hipersensibilidade, salivação, paresia e paralisia progressiva. Através da macroscopia observa-se, nos animais que apresentam evolução clínica mais longa, necrose no músculo esquelético. Microscopicamente verificam-se neurônios tumefeitos com citoplasma arredondado, eosinofílico e vacuolizado. Neurônios picnóticos com citoplasma enrugado podem estar presentes. Vacuolização pode ocorrer também na substância branca (LORETTI et al., 2003b; BARROS et al., 2006). A diferenciação com a intoxicação por *S. carpinifolia* pode ser feita, principalmente através da epidemiologia, verificando o consumo de alimentos que possam estar contaminados com o fungo e pela observação dos sinais clínicos.

A BSE (encefalopatia espongiforme bovina ou “doença da vaca louca”) é uma doença crônica e transmissível do sistema nervoso central (SNC) de bovinos e faz parte de um grupo complexo de doenças neurodegenerativas que afetam pessoas e animais, conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs). Apesar de nunca ter sido diagnosticada no Brasil, a BSE deve fazer parte do diagnóstico diferencial de doenças que cursam com vacuolização neuronal devido ao grande impacto causado pelas EETs. Clinicamente observa-se decréscimo na produção de leite, perda de peso, nervosismo, medo ou agressividade. Hipersensibilidade ao toque, ao som e à luz são distúrbios comuns. Frequentemente nota-se também andar rígido, incoordenação, hipermetria e ataxia. A ataxia grave evolui para quedas e finalmente paresia dos membros pélvicos. Macroscopicamente se observam lesões. Microscopicamente a lesão mais importante são vacúolos no pericário. Esses vacúolos, únicos ou múltiplos, distendem o pericário, produzindo neurônios balonosos que conservam apenas uma fina margem de citoplasma. A distribuição da lesão é bastante regular e apresenta-se, em 99,6%, no bulbo, na região sobre o óbex (BARROS et al., 2006). Diferentemente da BSE, os vacúolos em neurônios, células foliculares da tireóide e células acinares pancreáticas, observados em casos de intoxicação por *S. carpinifolia* possuem distribuição difusa e dão ao citoplasma dessas células aspecto distendido e espumoso.

## 6. CONCLUSÕES

*Sida carpinifolia* é tóxica para bovinos, quando ingerida em quantidades superiores a 10g/kg, por um período de 120 dias produzindo alterações clínicas leves. Quando ingerida em doses de 30 e 40 g/kg por um período de 150 dias produz sinais nervosos moderados a severos.

Essa planta quando ingerida por bovinos jovens, além das alterações clínicas neurológicas, produz subdesenvolvimento corporal com deformações da arcada dentária.

As principais lesões histológicas produzidas por *Sida carpinifolia* em bovinos são: tumefação, vacuolização e necrose neuronal principalmente nos neurônios de Purkinje e vacuolização das células foliculares da tireóide e células acinares do pâncreas.

O consumo de *S. carpinifolia* por tempo prolongado produz doença de depósito lisossomal em bovinos.

A doença de bovinos com tremores de cabeça e pescoço, e com baixo desenvolvimento corporal que ocorre no Alto Vale do Itajaí está relacionada à ingestão prolongada de *Sida carpinifolia*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, D.J. Swainsonine affects the processing of glycoproteins *in vivo*. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 136, n. 1. p. 110-113, Oct. 1983.

AGAMANOLIS, D.P. The pathology of lysosomal storage diseases. **Pathology annual**, v. 30, p. 247-285, 1995.

AGÊNCIA TURISMO CATARINENSE. Mapas de todos os municípios e mapas de todas as regiões, disponível em: <http://www.turismocatarinense.tur.br/> [acesso em: 14/11/2006].

ALROY, J. et al. Biochemical, ultrastructural and histochemical studies of cat placenta deficient in activity of lysosomal alpha mannosidase. **Placenta**, v. 8, n. 5, p. 545-553, 1987.

ARMESTO, R.R. et al. Intoxicacion en cabras por ingestion de *Ipomoea hieronymi* var. *Calchaquina* en la provincia de Catamarca, Argentina. **Veterinaria Argentina**, v. 21, n. 205, p. 232-241, Jul. 2004.

ARMIÉN, A.G. et al. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 170-184, 2007.

BALOGH, K.K.I.M. et al. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 266-273, 1999.

BARBOSA, R.C. et al. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon**, v. 47, p. 371-379, 2006.

BARROS, C.S.L. et al. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**. Montes Claros, MG: Valée, 2006. 207p.

BARROS, S.S. et al. *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* and *Solanum* sp. Poisoning in cattle: ultrastructural changes in the cerebellum. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 1987.

BRAUN, K. et al. Production of swainsonine by endophytes of locoweed. **Mycology Research**, v. 107, n. 8, p. 980-988, 2003.



BURDITT, L.J. et al. Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. **Biochemical Journal**. v. 189, p. 467-473, 1980.

CHOTAL, K. et al. The uptake of swainsonine, a specific inhibitor of  $\alpha$ -D-Mannosidase, into normal human fibroblasts in culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. 21, p. 107-117, 1983.

COLEGATE, S.M.; DORLING, P.R.; HUXTABLE, C.R. A spectroscopic investigation of swainsonine: an alpha-mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. **Australian Journal of Chemical**, v. 32, p. 2257-2264, 1979.

COLODEL, E.M. et al. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 51-57, Abr./Jun. 2002a.

COLODEL, E.M. et al. Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 177-178, Jun 2002b.

COLODEL, E.M. **Intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos**. 2005, 88 p. tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COLODEL, E.M. Edson Moleta Colodel, Professor de Anatomia Patológica Especial dos Animais Domésticos, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, comunicação pessoal, Fev. 2006.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO BRASIL. Resolução CFMV nº 714, de 20 de junho de 2002, 2002.

DAMIR, H.A.; ADAM, S.; TARTOUR, G. The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 316-319, Aug. 1987.

DANTAS, A.F.M. et al. Swainsonine induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. **Toxicon**, v. 49, n. 1, p. 111-116, 2006.

DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1983. 470p.

DORLING, R.; HUXTABLE, C.R. ; COLEGATE, S.M. Inhibition of lysosomal  $\alpha$ -Mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. **Biochemistry Journal**, n. 191, p. 649-651, 1980.

DORLING, R.; HUXTABLE, C.R. ; VOGEL, P. Lysosomal storage in *Swainsona* spp. toxicosis: An induced mannosidosis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 4, p. 285-298, 1978.

DRIEMEIER, D. et al. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in goats. **Veterinary Pathology**. v. 37, n. 2, p. 153-159. 2000.

ELBEIN, A. et al. Swainsonine: An inhibitor of glycoprotein processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.78, n. 12, p. 7393-7397, 1981.

FUHRMANN, U.; BAUSE, E.; PLOEGH, H. Inhibitors of oligosaccharide processing. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 825, p. 95-110, 1985.

FURLAN, F.H. et al. *Sida carpinifolia* em bovinos-Relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 1, p. 09, Jul. 2005.

GARDNER, D.R. et al. Correlation of an endophytic fungus (*Alternaria* sp.) with the presence of swainsonine in Lambert locoweed (*Oxytropis lambertii*), In: ACAMOVIC, T.; STEWART, C.S.; PENNYCOTT, T. **Poisonous Plants and Related Toxins**. Wallingford, Oxon, UK: CABI, 2004. 586p. p. 32-37.

GAVA, A. et al. *Phalaris angusta* (Gramineae) como causa de enfermidade neurológica em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 35-38, 1999.

GAVIER-WIDEN, D. et al. Histological observations on the brains of symptomless 7 year-old cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, n. 1, p. 52-59, 2001.

GODOY, G.S. et al. Intoxicação natural por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 1, p. 25, Jul. 2005.

HARAGUCHI, M. et al. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4995-5000, 2003.

HENRIQUES, A.T. et al. Análise farmacológica preliminar e atividade antiinflamatória das folhas de *Sida carpinifolia* (L.f.) K. Schum., Malvaceae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 70, n. 3, p. 55-58, 1989.

JAMES, L.F.; HARTLEY, W.J.; VAN KAMPEN, K.R. Syndromes of *Astragalus* poisoning in livestock. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 2, p. 146-150, Jan. 1981.

JOLLY, R.D. Animal model of human diseases: mannosidosis of children, other inherited lysosomal storage diseases. **American Journal of Pathology**, v. 74, n. 1, p. 211-214, Jan. 1974.

JOLLY, R.D. et al. Screening for generic diseases: principles and practice. **Advanced in Veterinary Science and Comparative Medicine**. v. 25, p. 245-276, 1981.

JOLLY, R.D.; THOMPSON, K.G. The pathology of bovine mannosidosis. **Veterinary Pathology**, v. 15, p. 141-152, 1978.

JOLLY, R.D.; WALKLEY, S.U. Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. **Veterinary Pathology**, v. 34, n. 6, p. 527-548, 1997.

JUBB, K.V.F.; HUXTABLE, C.R. The nervous system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Academic Press, 1992. v. 1, 780 p. p. 309-320.

KHOLKUTE, S.D. et al. Antifertility activity of indigenous plants *Sida carpinifolia* Linn. and *Podocarpus brevifolius* Stapf in female rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 16, p. 696-698, jun. 1978.

KING, N.W.; ALROY, J. Deposições intracelulares e extracelulares; degenerações. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. (ed.) **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p. p. 27-61.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Sida carpinifolia* L.f. In: **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1995. Tomo III. p. 131-134.

LAWS, L.; ANSON, R.B. Neuronopathy in sheep fed *Swainsona luteola* and *Swainsona galegifolia*. **Australian Veterinary Journal**. v. 44, p. 447-452, Oct. 1968.

LEINEKUGEL, P. et al. Quantitative correlation between the residual activity of beta hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. **Human Genetic**, v. 88 p. 513-523, 1992.

LINDSAY, K.B.; PYNE, S.G. Asymmetric synthesis of (-)-swainsonine, (+)-1,2-di-epi-swainsonine, and (+)-1,2,8-tri-epi-swainsonine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 22, p. 7774-7780, Nov. 2002.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 5 ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2000. p. 471-478.

LORETTI, A.P. et al. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 434-438, 2003a.

LORETTI, A.P. et al. Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 123-132, 2003b.

LUZI, P. et al. Analysis of the 5' flanking region of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. **Biochemical and Molecular Medicine**, v. 62, p. 159-164, 1997.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. 380 p.

MAENHOUT, T. et al. Mannosidosis in a litter of Persian cats. **Veterinary Record**, v. 122, n. 15, p. 351-354, Apr. 1988.

MOLYNEUX, R.J. et al. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. calobra]) and correlation with toxicity. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 6, p. 878-886, 1995.

MOLYNEUX, R.J.; JAMES, L.F. Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*), **Science**, v. 216, p. 190-191, Apr. 1982.

MUNTZ, F.H.A.; BONNING, L.E.; CAREY, W.F.  $\alpha$ -Mannosidosis in a Guinea Pig. **Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 424-426, Aug. 1999.

OCKERMAN, P.A. Deficiency of beta-galactosidase and alpha-mannosidase--primary enzyme defects in gargolism and a new generalized disease? **Acta Paediatrica Scandinavica**, Supplement 177, p. 35-36, 1967.

PAULOVICH, F. B. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, p. 473-477, 2002.

PEARSON, W.H.; HEMBRE, E.J. Practical synthesis of (-)-Swainsonine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 7217-7221, Oct. 1996.

PIENAAR, J. G. et al. Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N.E Br. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 2, p. 67-64, 1976.

PROPHET, E.B. et al. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: American registry of pathology, 1992, 274p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p. p. 1570.

RAZAVI, H.; POLT, R. Asymmetric syntheses of (-)-8-epi-swainsonine triacetate and (+)-1, 2-Di-epi-swainsonine. Carbonyl addition thwarted by an unprecedented aza-pinacol rearrangement. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 28, p. 5693-5706, Sep. 2002.

RIET-CORREA, F. et al. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *Fastigiatum* as a causa of cerebelar degeneration in cattle. **Cornell Veterinary**, v. 73, p. 240-256, 1983a.

RIET- CORREA, F. et al. Intoxicação por *Claviceps paspali* em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 59-65, 1983b.

ROMERO et al. Association of a fungal endophyte with seed tissue and locoweed toxicity. In: American Phytopathology Society Annual Meeting, 2002, Milwaukee, Wisconsin, **2002 meeting Abstracts**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/meetings/2002/abstracts/a02ma510.htm>> Acesso em: 10 mar. 2006.

SCHNEIDER, M.J. et al (1S,2R8R8αR)-1,2,8-trihydroxyoctahydroindolizine (swainsonine), an α-mannosidase inhibitor from *Rhizoctonia leguminicola*. **Tetrahedron**, v. 39, p. 29-32. 1983.

SEITZ A.L. et al. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 15-20, Jan./Mar. 2005.

SIM, K.L.; PERRY, D. Analysis of swainsonine and its early metabolic precursors in cultures of *Metarhizium anisopliae*. **Glicoconjugate Journal**, v. 14, n. 5, p. 661-668, 1997.

SOUSA, S.S.; IRIGOYEN, L.F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 116-122, 1999.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. St. Louis, Missouri: Mosby, 1994. 527p. Degenerative diseases of the central nervous system: metabolic and circulatory disorders. p. 208-349.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 310 p.

TULSIANI, D.R.P.; HARRIS, T.M.; TOUSTER, O. Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 14, p. 7936-7939, July. 1982.

TULSIANI, D.R.P.; TOUSTER, O. Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver Golgi preparations. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7578-7585, Jun. 1983.

WARREN, C.D. et al. The strutures of oligosaccharides excreted by sheep with swainsonine toxicosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 29, p. 15041-15049, Oct. 1988.

WHITTEN, J.H.; WALKER, D. Neuronopathy and pseudolipidosis in Aberdeen Angus calves. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 74, p. 281-288, 1957.

WINCHESTER, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. **Glycobiology**, v. 15, n. 6, p. 1R-15R, 2005.