

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DOENÇA NEUROLÓGICA EM RUMINANTES ASSOCIADA AO CONSUMO
DE BAGAÇO DE MALTE CONTAMINADO POR *Aspergillus clavatus***

Pedro Soares Bezerra Júnior

**PORTO ALEGRE
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DOENÇA NEUROLÓGICA EM RUMINANTES ASSOCIADA AO CONSUMO DE
BAGAÇO DE MALTE CONTAMINADO POR *Aspergillus clavatus*

Autor: Pedro Soares Bezerra Júnior
Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias na
área de Patologia Veterinária.
Orientador: Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE
2008

B574d Bezerra Júnior, Pedro Soares

Doença neurológica em ruminantes associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus* / Pedro Soares Bezerra Júnior - Porto Alegre: UFRGS, 2008.

72f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2008. David Driemeier, Orient.

1. *Aspergillus clavatus* 2. Intoxicação 3. Patologia
4. Bovinos 5. Ovinos I. Driemeier, David, Orient. II. Título

CDD 619.6026



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APROVADO POR:

Prof. Dr. Aldo Gava,
Membro da Banca.

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros ,
Membro da Banca.

Prof. Dr. Laerte Ferreira,
Membro da Banca.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Ao meu pai Seu Pedro e a minha saudosa mãe Dona Celina pelas oportunidades e exemplos de vida.

À minha esposa Isis e aos nossos filhos Cíntia e Pedro pelo amor fundamental a minha vida e pela paciência, apoio e estímulo fundamentais nessa empreitada.

Ao meu orientador David Driemeier pela oportunidade, pelos exemplos de profissionalismo e dedicação, e pela amizade e paciência.

Aos amigos do SPV-UFLA, Flademir e Mary, pela compreensão e apoio a essa empreitada. Aos amigos do UFLA pelo apoio nos momentos de perda e pela liberação e apoio para realização deste curso.

Aos amigos do SPV-UFRGS pela ajuda na realização deste trabalho, no aprendizado eterno e pelo carinho com que receberam a mim e a minha família: Adriana Santos, Adriana Meirelles, Alexandre Moreira, André Corrêa, André Dalto, Ângela de Souza, Caroline, Daiene, Daniela Rozza, Djeison, Eduardo, Elisa Teixeira, Elisa Tesser, Eloísa, Fábio Guagnini, Giovana, Juliana, Juliano, Luciana, Marcele, Marília Belmonte, Mauro, Nádia, Paulo, Pedroso, Priscila, Saulo e Xenia. Aos amigos Felipe Pierezan, Ingeborg Langohr e Rachel Rech pela ajuda no trabalho e na aquisição de referências difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS pela colaboração imprescindível neste trabalho, Andréia Spanamberg, Laerte Ferreiro e Edna Sanches.

Ao Dr. Aníbal Armién pelas dicas de lectina-histoquímica e pela ajuda na interpretação das lesões nos gânglios. Ao Dr. Cláudio Cruz pela revisão dos artigos. Ao Dr. Henrique Resende pela ajuda com os termos anatômicos das áreas lesadas. Aos Professores Marcos Duarte e Rodolfo Voll pela ajuda na interpretação dos sinais clínicos. Pelas análises de microscopia eletrônica ao Dr. Severo Barros, ao Mauro Soares e a Dra. Ana

Schild. A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste projeto.

Aos bons amigos e Mestres da UFRRJ/Embrapa, UFSM, UDESC, UFPel, UFRGS, UFPA e UVV que foram e são tão importantes na minha formação profissional e a quem sempre recorro nos momentos em que “o bicho pega”.

Aos estudantes da veterinária da UFLA pelo constante estímulo de aprimoramento.

À família Nascimento Bezerra e Santos Abel que são minha base.

Ao Colégio-Curso Martins que, com a concessão de bolsas, permitiu que vários como eu “invadissem essa praia”.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

RESUMO

São descritos dois surtos de uma doença neurológica que afetou rebanhos bovinos de aptidão leiteira alimentados com bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*, no município de Viamão, estado do Rio Grande do Sul. A morbidade foi semelhante em ambos os surtos (em torno de 30%). Em uma propriedade de 10 bovinos que consumiam o subproduto três adoeceram e morreram e na outra de 33 bovinos, 10 foram afetados e 5 desses morreram. A evolução clínica da doença variou de 5 a 64 dias. Dos animais que se recuperaram apenas um permaneceu com seqüelas locomotoras leves. Os sinais clínicos eram predominantemente locomotores e incluíam tremores musculares, hiperestesia e membros pélvicos com ataxia, paresia e paralisia progressivas e apoio sobre os boletos. Os distúrbios locomotores eram intensificados pelo exercício que em geral desencadeava quedas. Havia queda na produção leiteira, mas o apetite e dipsia foram mantidos até próximo da morte ou eutanásia. Cinco bovinos foram necropsiados e dois apresentaram lesões macroscópicas nos músculos esqueléticos, principalmente dos membros pélvicos e torácicos, que consistiam de áreas claras bilaterais e relativamente simétricas. Histologicamente, as lesões musculares se caracterizavam por miopatia degenerativo-necrótica segmentar, por vezes associada a mineralização, regeneração e fibrose. No sistema nervoso os principais achados microscópicos consistiam de degeneração e necrose neuronal cromatolítica em núcleos nervosos específicos no tronco encefálico, cornos ventrais da medula espinhal e gânglios espinhais, trigeminal, estrelado e celíaco. No tronco encefálico as lesões foram observadas nos núcleos vermelhos, formação reticular da ponte, motor dorsal do nervo vago e ambíguo. Em dois bovinos havia adicionalmente degeneração walleriana nos funículos dorsais da medula espinhal, nervos isquiáticos e fibulares. Através da lectina-histoquímica foi evidenciado acúmulo de glicoconjugados contendo oligossacarídeos N-ligados ricos em manose no pericário de neurônios cromatolíticos de bovinos. As lectinas *Concanavalin ensiformis* e *Triticum vulgaris* apresentaram as melhores marcações. A doença foi reproduzida experimentalmente em sete ovinos. A três destes foram administrados 40g/kg por dia do bagaço de malte utilizado nas propriedades onde ocorreram os surtos espontâneos em bovinos por períodos de 2, 3 ou 19 dias. Os primeiros sinais clínicos foram observados 51 a 147 horas após a primeira administração e a evolução clínica até o óbito ou eutanásia foi de aproximadamente 39 a 288 horas. A quatro ovinos foram administrados 12ml/kg por dia de cultura pura de *A. clavatus* por 4 ou 6 dias. Os primeiros sinais clínicos nesses ovinos foram observados 72 horas após a primeira administração e a evolução clínica foi de 37 a 96 horas. Os sinais clínicos foram semelhantes aos dos casos naturais, sendo proeminentes a hiperestesia, os tremores musculares e a taquipnéia. Nenhum dos sete ovinos apresentou lesões macroscópicas. A distribuição topográfica das lesões neuronais nos ovinos foi semelhante à dos bovinos. Porém, a tumefação neuronal e as alterações regressivas eram menos proeminentes nos ovinos. Três de sete ovinos apresentaram lesões musculares que foram leves e não associadas a processos regenerativos ou mineralização.

ABSTRACT

*Two outbreaks of a neurological disease affecting herds of dairy cattle that were fed moldy beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus* in the county of Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil, are described. The morbidity of both outbreaks was of 30%. Among 10 bovines that had fed the beer by-product at one farm, three were affected and died. On another farm, among 33 bovines, 10 were affected and five died. The clinical evolution varied from 5 to 64 days. Only one of the animals that recovered from the disease remained with mild locomotor sequels. The clinical signs were predominantly locomotor and included muscle tremors, hyperesthesia and progressive posterior ataxia, paresis and paralysis with knuckling of fetlocks of the hind limbs. Gait abnormalities were more pronounced after exercises that in general led to falling down. There was also reduced milk production, but appetite and water intake were maintained until close to death or euthanasia. Five cattle were necropsied and two presented macroscopic lesions consisting of white areas with bilateral symmetric distribution mainly in pelvic and thoracic limbs muscles. Histologically muscular lesions were characterized by segmental degenerative-necrotic myopathy, sometimes associated with mineralization, regeneration and fibrosis. In the nervous system the main histological finding consisted of chromatolytic neuronal degeneration and necrosis in selected nuclei of the brain stem, the ventral horn of the spinal cord and spinal, trigeminal, stellate and celiac ganglions. In the brain stem lesions were observed in the red nuclei, reticular formation of the pons and dorsal motor of the vagus nerve and ambiguous nuclei. In two cattle there was Wallerian degeneration in dorsal funiculi of the spinal cord and ischiadic and fibular nerves. The lectin-histochemistry showed accumulation of glycoconjugates with N-linked high-mannose oligosaccharides in the chromatolytic neuron perikaryon of bovines. Concanavalin ensiformis and *Triticum vulgare* lectins showed the best staining. The disease was reproduced experimentally in seven sheep. Three sheep received 40g/kg/day of beer by-product originated from two farms where outbreaks of *A. clavatus* poisoning in cattle had occurred. The administration of by-product was carried on for two, three or 19 days. The first clinical signs in these sheep were observed after 51 to 147 hours of the first administration of by-product, and the clinical course lasted from 39 to 288 hours. Four sheep received 12 ml/kg/day of pure culture of the fungus for four or six days. In these sheep the first clinical signs were observed 72 hours after the first administration and the clinical evolution was of 37 to 96 hours. Clinical signs were similar to the natural cases, but hyperesthesia, muscle tremors and tachypnea were most prominent. There were no macroscopic lesions in sheep. The topographic distribution of the neuronal lesions in sheep and bovines was similar. However, the neuronal swelling and regressive alterations were less intensive. Three sheep presented mild muscle lesions.*

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 2.1. Bagaço de malte..... | 11 |
| 2.2. <i>Aspergillus clavatus</i> : características gerais..... | 12 |
| 2.3. <i>Aspergillus clavatus</i> : produção de micotoxinas..... | 13 |
| 2.4. Intoxicação por <i>Aspergillus clavatus</i> | 14 |
| 2.4.1. Sinais clínicos e dados epidemiológicos..... | 14 |
| 2.4.2. Macroscopia..... | 16 |
| 2.4.3. Microscopia..... | 17 |
| 2.4.4. Patogênese..... | 19 |
| 2.5. Lectina-histoquímica..... | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1. Casos naturais..... | 20 |
| 3.2. Reprodução experimental..... | 20 |
| 3.3. Processamento dos tecidos..... | 21 |
| 3.3.1. Microscopia, imuno-histoquímica e lectina-histoquímica..... | 21 |
| 3.4. Exames micológicos..... | 22 |
| 3.4.1. Isolamento e identificação <i>Aspergillus clavatus</i> | 22 |
| 3.4.2. Subcultivo..... | 23 |
| 3.4.3. Análise da patulina..... | 23 |
| 4. RESULTADOS..... | 24 |
| 4.1. Casos naturais..... | 24 |
| 4.1.1. Dados epidemiológicos..... | 24 |
| 4.1.2. Dados clínicos..... | 27 |
| 4.1.3. Macroscopia..... | 30 |
| 4.1.4. Microscopia..... | 30 |
| 4.1.5. Micologia e análise de patulina..... | 42 |
| 4.2. Reprodução experimental em ovinos..... | 43 |
| 4.2.1. Delineamento experimental e dados clínicos..... | 43 |
| 4.2.2. Macroscopia e microscopia..... | 44 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 6. CONCLUSÕES..... | 60 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |
| APÊNDICE A..... | 65 |
| APÊNDICE B..... | 69 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o quinto maior produtor de cerveja do mundo, com uma média de 8,5 bilhões de litros ao ano. No país há cerca de 47 fábricas, em geral de grande e médio porte. A região Sul responde por 14,8% da produção, ficando atrás apenas das regiões Sudeste (57,5%) e Nordeste (17,3%) (SANTOS & RIBEIRO, 2005).

Grandes quantidades de subprodutos são geradas pelas cervejarias, sendo o bagaço de malte, quantitativamente, o principal deles (a cada 100 litros de cerveja produzida são gerados de 14 a 20 quilos de bagaço de malte). Este material que seria descartado, ocasionando um grande impacto ambiental, por possuir boas características nutricionais, é enviado, por grande parte das cervejarias, a empresas que o disponibilizam para alimentação animal. O bagaço de malte tem sido oferecido aos criadores principalmente na forma úmida, com cerca de 80% de umidade (SANTOS & RIBEIRO, 2005). Em razão da disponibilidade e de seu menor custo o subproduto vem sendo amplamente utilizado na alimentação de bovinos com aptidão leiteira no Rio Grande do Sul (BARROS et al., 2006).

O consumo de subprodutos de cervejarias ou destilarias contaminados pelo fungo *Aspergillus clavatus* tem sido associado a uma doença neurológica em bovinos e ovinos em diversos países (KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; GILMOUR et al., 1989; SABATER-VILAR et al., 2004), incluindo o Brasil (LORETTI et al., 2003). *A. clavatus* é um fungo saprófito cosmopolita normalmente isolado do solo e de fezes, mas que pode contaminar principalmente cereais estocados com alto teor de umidade em temperaturas superiores a 13°C. Nessas condições o fungo tende a predominar sobre outros (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997). Embora *A. clavatus* seja um conhecido produtor de vários metabólitos tóxicos, a(s) toxina(s) responsável(is) pelo quadro clinicopatológico ainda não está(ão) bem determinada(s). Alguns autores especulam que a enfermidade seja resultado da ação sinérgica de várias micotoxinas (VARGA et al., 2003).

Os principais sinais clínicos descritos são hiperestesia, tremores musculares, ataxia, andar sobre os boletos dos membros pélvicos, paresia e paralisia progressiva. À necropsia, animais que sobrevivem por longos períodos, podem apresentar áreas pálidas nos músculos esqueléticos dos membros pélvicos e torácicos. Alguns casos apresentam ainda focos pálidos no coração (KELLERMAN et al., 2005). Microscopicamente há degeneração e necrose de grandes neurônios especialmente dos cornos ventrais da

medula espinhal, núcleos específicos da medula oblonga, mesencéfalo e tálamo, e gânglios espinhais (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 2002; KELLERMAN et al., 2005). Degeneração axonal central e periférica com perda secundária de mielina tem sido identificada em alguns surtos (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994). O presente trabalho tem como objetivos descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de dois surtos da doença neurológica em bovinos que consumiam bagaço de malte contaminado por *A. clavatus*. Também serão descritos os aspectos clínico e patológico do quadro em ovinos intoxicados experimentalmente com o bagaço de malte utilizado nas propriedades durante os surtos e com a cultura pura de *A. clavatus*. Nas lesões neurológicas serão abordados e discutidos alguns aspectos da morfologia e imuno-histoquímica, além de possíveis mecanismos patogênicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bagaço de malte

O bagaço de malte é o subproduto formado pela parte sólida obtida da filtração do mosto cervejeiro antes da fervura (Figura 1). O mosto cervejeiro é gerado após a moagem do malte e maceração do malte e do adjunto, este último formado por outros grãos como arroz, milho e trigo. Na maceração é acrescentada água aquecida aos grãos de malte moídos (65°C para o malte e 120°C para o adjunto). Para filtração e conseqüente geração do bagaço de malte o mosto é resfriado até 75 a 78°C. O bagaço de malte é quantitativamente o principal subproduto, sendo gerado de 14 a 20 quilos a cada 100 litros de cerveja produzida. A grande produção anual de cerveja no país, em média de 8,5 bilhões de litros, dá uma idéia da enorme quantidade deste subproduto gerada neste processo industrial. A Região Sul do país responde por 14,8% desta produção. Além do bagaço de malte, outros subprodutos sólidos gerados são o *trub* grosso obtido na decantação do mosto após a fervura e o *trub* fino obtido na filtração após a fermentação. Em alguns casos estes subprodutos são misturados ao bagaço de malte e disponibilizados para alimentação animal (SANTOS & RIBEIRO, 2005).

O bagaço de malte é constituído principalmente de restos de casca e polpa de cevada, mas também de outros grãos como arroz, milho e trigo (SANTOS & RIBEIRO, 2005). Trabalhos têm demonstrado que o bagaço de malte possui boas características nutricionais apresentando em sua composição cerca de 28,4% de hemicelulose, 27,8% de lignina e 16,8% de celulose, além de menores proporções de proteínas, extrativos e cinzas (VAZ et al., 2005). Assim, em razão de suas características nutricionais, grande disponibilidade e menor custo este subproduto vem sendo amplamente utilizado na alimentação de bovinos com aptidão leiteira no Rio Grande do Sul (BARROS et al., 2006) e outras regiões do país. O bagaço de malte tem sido oferecido aos criadores principalmente na forma úmida, com cerca de 80% de umidade (SANTOS & RIBEIRO, 2005).

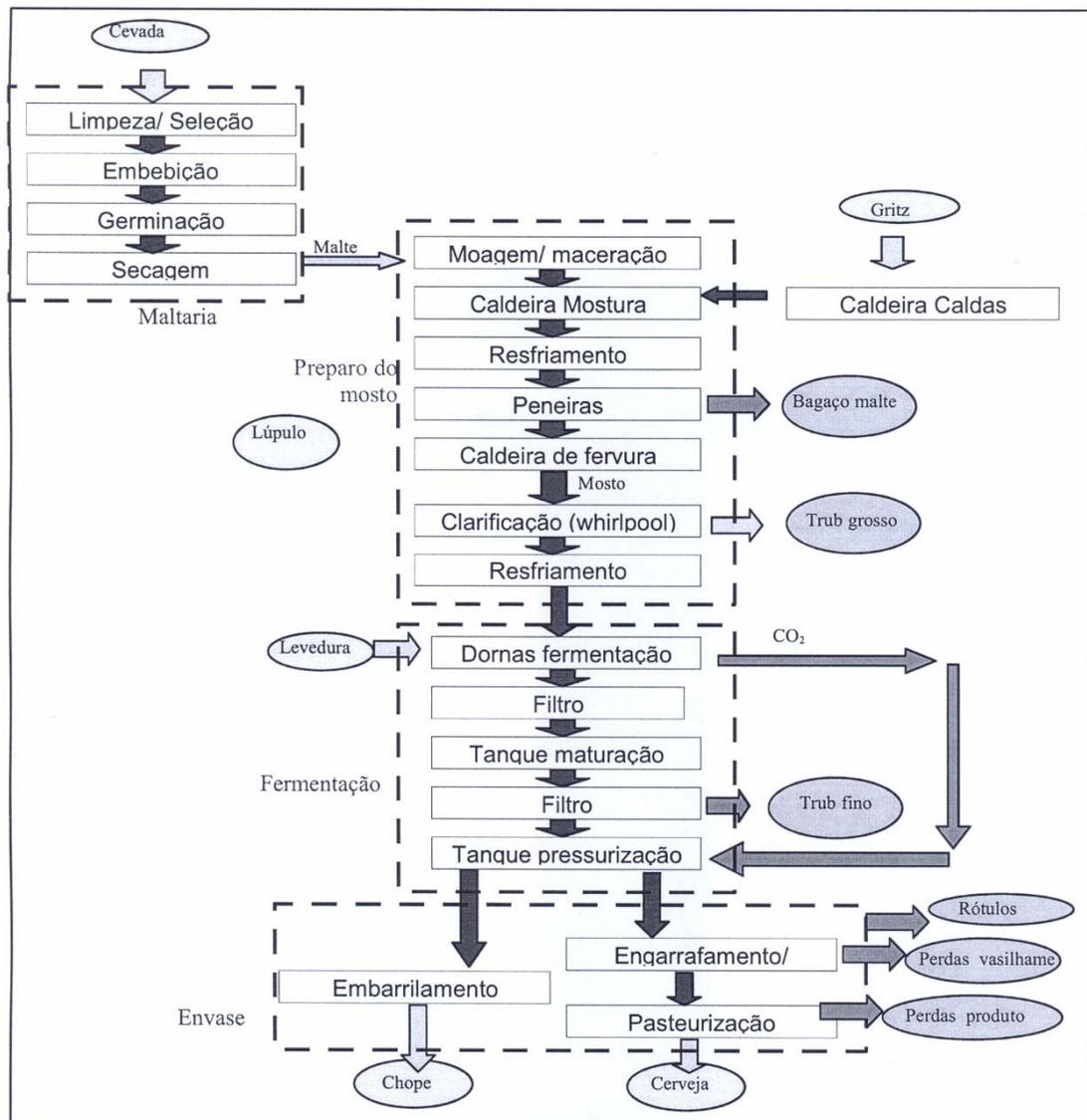


FIGURA 1 - Fluxograma de processo genérico da produção de cerveja. São ilustrados em cinza os principais subprodutos ou resíduos e as etapas onde estes são gerados (SANTOS & RIBEIRO, 2005).

2.2. *Aspergillus clavatus*: características gerais

O *A. clavatus* é um fungo sapróbico cosmopolita caracterizado macroscopicamente pela formação de colônias azul-esverdeadas e microscopicamente por vesículas em forma de clavos, grandes cabeças conidiais verde azuladas e conidióforos com 1 a 4mm de comprimento (VARGA et al., 2003). O fungo é normalmente isolado de solo, fezes e materiais vegetais em decomposição, mas também ocorre em produtos estocados com alto teor de umidade, principalmente cereais (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; VARGA et al., 2003). Embora seja considerado

um raro contaminante de grãos, há evidências de que quando presente *A. clavatus* tende a predominar sobre outros fungos particularmente em temperaturas maiores que 13 a 16°C. Um intenso crescimento é observado com a temperatura entre 20 e 35°C (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; McKENZIE et al., 2004) e com pH entre 6,5 a 7,5 (McKENZIE et al., 2004). *A. clavatus* demonstra ser especialmente bem adaptado a crescer durante a produção do malte, particularmente em condições de completa hidratação durante a germinação do grão (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; GILMOUR et al., 1989; VARGA et al., 2003; SABATER-VILAR et al., 2004). A umidade mínima requerida é de cerca de 88%, com ótimo crescimento a 93 a 98% (McKENZIE et al., 2004).

2.3. *Aspergillus clavatus*: produção de micotoxinas

A natureza da(s) micotoxina(s) envolvida(s) na toxicose relacionada ao *A. clavatus* ainda não está bem esclarecida (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004). Várias toxinas têm sido isoladas de *A. clavatus*, como patulina, brefeldina A, citocalasina E e K, ascladiol, clavatul, ácido cójico e diversas substâncias tremorgênicas, como triptoquivalona, nortriptoquivalona, triptoquivalina e gliantripina (DEMAIN et al., 1976; KELLERMAN et al., 1976; KELLERMAN et al., 1984; WANG et al., 2002; VARGA et al., 2003; SABATER-VILAR et al., 2004). Entretanto, nenhuma destas foi testada em ruminantes para determinar sua participação na patogênese da doença (McKENZIE et al., 2004). Alguns autores, no entanto, especulam que a enfermidade seja resultado da ação sinérgica de várias micotoxinas (VARGA et al., 2003).

Das toxinas de *A. clavatus*, a patulina tem sido uma das mais investigadas (McKENZIE et al., 2004). Camundongos inoculados por via intraperitoneal com essa toxina apresentaram sinais clínicos semelhantes aos observados em bovinos (KELLERMAN et al., 1976). As lesões neuronais nesses camundongos, embora consideradas semelhantes às dos bovinos, são restritas ao córtex cerebral (CAPITAINE & BALOUET, 1974). A inoculação intraperitoneal de triptoquivalona e triptoquivalina em ratos provoca tremores e hiperestesia semelhantes aos observados nos casos naturais que persistem por cinco dias, mas não causa lesões macro ou microscópicas no sistema nervoso ou outros tecidos (McKENZIE et al., 2004). Kellerman et al. (1976) não detectou patulina, triptoquivalona ou nortriptoquivalona na fração mais tóxica extraída

de um resíduo de cerveja de sorgo utilizada em uma fazenda onde ocorreu um surto e que reproduziu a doença quando administrado a ovinos. A inoculação de citocalasina E causou a morte de ratos 2 a 18 horas após inoculação e edema cerebral, ascite e hemorragia pulmonar (McKENZIE et al., 2004).

Alguns autores indicam que na cevada a produção de algumas das toxinas de *A. clavatus* é superior à obtida em outros grãos (DEMAIN et al., 1976). No entanto, a neurotoxicose também têm sido associada ao crescimento em outros grãos, como trigo, milho e sorgo (VILLALOBOS et al., 1995; KELLERMAN et al., 2005).

As temperaturas e tempos de incubação considerados bons para produção de toxinas para o *A. clavatus* são variáveis. Os seguintes esquemas de cultivo têm sido propostos para a produção de toxinas tremorgênicas: 37°C por 7 dias, 30°C por 10-14 dias e 22°C por 17 dias (DEMAIN et al., 1976; TREMASOV et al., 1993). A fermentação sob agitação é mais satisfatória que a sob condições estáticas (DEMAIN et al., 1976).

2.4. Intoxicação por *Aspergillus clavatus*

2.4.1. Sinais clínicos e dados epidemiológicos

Os sinais clínicos da intoxicação por *A. clavatus* em bovinos incluem principalmente hiperestesia, tremores, ataxia, paresia e paralisia progressivas particularmente nos membros pélvicos que pode evoluir para a morte em poucos dias a várias semanas (KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004). A morbidade é muito variável entre os surtos, sendo descritos valores entre 17 a 100% (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003; VAN DER LUGT et al., 1994; EL-HAGE & LANCASTER, 2004). A letalidade, incluindo animais mortos espontaneamente e eutanasiados, também é variável, com valores entre 31 a 87% (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004). Animais sobreviventes podem permanecer com sinais locomotores (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989). Embora em alguns surtos as mortes cessem com a retirada o alimento contaminado (LORETTI et al., 2003), alguns trabalhos descrevem a ocorrência de casos novos mesmo após a remoção

do alimento contaminado (GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004) por um período de até 18 dias (EL-HAGE & LANCASTER, 2004).

Os sinais clínicos são com frequência leves ou mesmo não evidentes quando os animais estão em repouso, mas tornam-se mais intensos ou perceptíveis com a movimentação dos animais (KELLERMAN et al., 1984; 2005; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004). Os animais afetados têm andar atáxico, membros rígidos, passos curtos, tremores e algumas vezes arrastam as patas, apoiadas sobre os boletos dos membros pélvicos. Quedas repetidas são frequentes (KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004;). Depois de um período variável de repouso eles podem levantar-se, muitas vezes com dificuldade (LORETTI et al., 2003; KELLERMAN et al., 2005). Alguns animais podem assumir a posição de cão sentado ou ficar em decúbito esternal com membros posicionados de forma anormal (KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; SABATER-VILAR et al., 2004). Os tremores musculares e a hiperestesia podem não ocorrer em alguns surtos (VAN DER LUGT et al., 1994; KELLERMAN et al., 2005). A movimentação pode precipitar também rápido cansaço, dificuldade respiratória (KELLERMAN et al., 1984; 2005; GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004) e salivação (KELLERMAN et al., 1984; 2005; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004). Os bovinos permanecem atentos ao ambiente, com frequência há retenção do apetite (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004) e raramente há paralisia completa da língua, dos membros e da cauda (KELLERMAN et al., 1976; 2005). No entanto, em alguns surtos é relatada anorexia (GILMOUR et al., 1989; KELLERMAN et al., 2005). É descrita ainda constipação (KELLERMAN et al., 1976; 2005), hipermetria nos membros pélvicos (EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004), comportamento anormal (comportamento maníaco, agressividade, inquietude e reações de medo a objetos em seu caminho, sombras ou outros animais) (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989; COLODEL et al., 2004; McKENZIE et al., 2004), queda na produção de leite (McKENZIE et al., 2004; VAN DER LUGT et al., 1994). Embora sejam descritas raramente reação febril leve e estase ruminal, alguns autores consideram a doença não

febril e observam persistência dos movimentos ruminais até os estágios terminais da doença (KELLERMAN et al, 1976).

Os sinais clínicos em ovinos são bastante semelhantes aos citados em bovinos. São descritos hiperestesia e tremores musculares progressivos, caminhar com passos curtos, arrastando os membros pélvicos (KELLERMAN et al., 1976; 1984), apoiados sobre boletos dos membros pélvicos (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989) ou com membros pélvicos rígidos (GILMOUR et al., 1989), evoluindo para decúbito esternal (KELLERMAN et al., 1976; 1984; GILMOUR et al., 1989) com membros dispostos de forma anormal (KELLERMAN et al., 1984). Respiração ofegante (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989) e anorexia (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989) são também descritos. A morbidade em surtos pode ser alta, chegando a 100% (GILMOUR et al., 1989), com letalidade variável. Em trabalhos experimentais em ovinos os sinais clínicos foram observados 5 a 13 dias após a alimentação com o resíduo de cervejaria contaminado e a morte ou eutanásia ocorreu 7 a 10 dias após início dos sinais clínicos (KELLERMAN et al., 1976; 1984). No entanto, em alguns experimentos em ovinos pode não se perceber sinais clínicos após semanas de ingestão do resíduo, embora os animais apresentem lesões no sistema nervoso (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003).

2.4.2. Macroscopia

As lesões macroscópicas em geral são mais proeminentes em bovinos muito afetados e que apresentam sinais clínicos por longos períodos (KELLERMAN et al., 1976; 2005) e podem não ser observadas em alguns surtos (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; MCKENZIE et al., 2004).

Os animais onde há lesões macroscópicas apresentam áreas branco-acinzentadas em grandes grupos musculares nos membros pélvicos e torácicos particularmente próximos das inserções e origens, com frequência acompanhadas por petéquias. Menos comumente os músculos podem ser difusamente pálidos (KELLERMAN et al., 1976; 2005; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004). Os músculos onde são descritas lesões incluem: gastrocnêmio, semimembrâneo, semitendíneo, quadríceps, adutor, pectíneo, reto femural, sartório, serrátil ventral, grácio, íleo-psoas, peitoral descendente, ascendente e transverso, músculos esternais e

músculos extensores dos membros torácicos (KELLERMAN et al., 1976, LORETTI et al., 2003). São descritos ainda edema nas fáscias intermusculares e petéquias (mais proeminentes ao longo de grandes nervos como o isquiático e braquial) (KELLERMAN et al., 1976) e ruptura bilateral do ligamento redondo da cabeça do fêmur (COLODEL et al., 2004). Lesões musculares em ovinos são muito leves (KELLERMAN et al., 1976) ou ausentes (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003).

Petéquias e equimoses são também descritas na maioria das superfícies serosas e sob o epicárdio e endocárdio (KELLERMAN et al., 1976). Alguns animais que sobrevivem por longos períodos podem apresentar pequenos focos pálidos de necrose no miocárdio dos músculos papilares e da parede do ventrículo esquerdo (KELLERMAN et al., 1976; 2005).

O sistema nervoso normalmente não apresenta lesões macroscópicas (KELLERMAN et al., 1984; 2005; GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003). Alterações descritas com pouca frequência no sistema nervoso são congestão das meninges de animais que morrem pouco tempo após o início dos sinais clínicos (KELLERMAN et al., 1976). Um estudo bastante distinto dos demais, descreve hemorragia e malácia cerebrocortical (JIANG et al. apud GILMOUR et al., 1989).

São descritos também leve edema pulmonar, alterações indicando estase nos pré-estômagos e constipação, e líquido sinovial turvo e escuro (KELLERMAN et al., 1976).

2.4.3. Microscopia

As lesões microscópicas mais significativas são degeneração e necrose de grandes neurônios especialmente dos cornos ventrais da medula espinhal e núcleos específicos da medula oblonga, mesencéfalo e tálamo (GILMOUR et al., 1989; KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004). No tronco encefálico as lesões afetam principalmente os núcleos vermelho (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 2002; EL-HAGE & LANCASTER, 2004), reticular da medula (EL-HAGE & LANCASTER, 2004), vestibular (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 2002), motor dorsal do nervo vago (VAN DER LUGT et al., 2002; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004), ambíguo (VAN DER LUGT et al., 2002) e do trato espinhal do nervo trigêmeo (VAN

DER LUGT et al., 2002). Os neurônios de gânglios espinhais são também afetados (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; 2002; SABATER-VILAR et al., 2004). Neurônios do córtex cerebral e cerebelar não são afetados (KELLERMAN et al., 1976; LORETTI et al., 2003).

Neurônios de animais afetados são tumefeitos e arredondados, com citoplasma eosinofílico, finamente granular e com lise completa ou central dos grânulos de Nissl, associada a vacúolos de diferentes tamanhos. Os núcleos destas células quando presentes são situados excentricamente junto à membrana celular, ovais ou riniformes, hipercromáticos e com nucléolos aumentados e basofílicos (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; 2002; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004, SABATER-VILAR et al., 2004;). Kellerman et al. (1976) observam que a tumefação neuronal ocorre principalmente em animais que sobrevivem por alguns dias com sinais clínicos. Em um surto foi observado no citoplasma de alguns neurônios pigmento marrom-acastanhado, finamente granular lembrando lipofucsina (KELLERMAN et al., 1984).

Com menor frequência pode ocorrer satelitose, neuronofagia e gliose focal em áreas presumivelmente antes ocupadas por neurônios (KELLERMAN et al., 1976; 1984; GILMOUR et al., 1989), particularmente em alguns casos mais crônicos (KELLERMAN et al., 1976).

Degeneração axonal com formação de câmaras de digestão e perda secundária de mielina é observada na substância branca ao redor de núcleos com neurônios afetados (KELLERMAN et al. 1976; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003) e na medula espinhal (KELLERMAN et al. 1976; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; SABATER-VILAR et al., 2004). Os tratos afetados na medula espinhal variam entre os surtos descritos. Podem ser afetados todos os tratos (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 2002), principalmente áreas ao redor dos cornos ventrais (KELLERMAN et al., 1976) ou os funículos laterais e ventrais poupando funículos dorsais e adjacentes à substância cinzenta (VAN DER LUGT et al., 1994). Lesões axonais semelhantes têm sido identificadas também em nervos periféricos em alguns surtos (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994). Vários nervos periféricos podem ser afetados, incluindo nervos espinhais, isquiádicos, femurais, fibulares, obturadores e radiais e plexos braquiais (SABATER-VILAR et al., 2004). Segundo Van der Lugt et al. (2002) as lesões axonais podem ser observadas também na substância cinzenta da medula espinhal e raízes ventrais e nos nervos

periféricos afetavam principalmente as porções proximais dos axônios. Sabater-Vilar et al. (2004), no entanto, descreve em alguns animais lesões axonais em nervos periféricos sem a observação de alterações em neurônios do sistema nervoso central. Em alguns surtos os animais apresentam lesões em neurônios do sistema nervoso central mas não em axônios da medula espinhal (LORETTI et al., 2003; McKENZIE et al., 2004) ou de nervos periféricos (EL-HAGE & LANCASTER, 2004).

As lesões nos músculos esqueléticos são caracterizadas por degeneração e necrose hialina (KELLERMAN et al., 1976; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004) acompanhada de mineralização (LORETTI et al., 2003). No miocárdio pode ocorrer degeneração e necrose de miofibras em casos crônicos (KELLERMAN et al., 1976). No entanto, essas lesões podem não ser observadas em alguns surtos (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004).

2.4.4. Patogênese

A patogênese das lesões neurológicas não está completamente esclarecida. Tem sido sugerido que a cromatólise seja a manifestação de uma injúria primária ao corpo do neurônio (KELLERMAN et al., 1976; 1984; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003). Neste sentido, a degeneração axonal, observada em alguns casos, seria secundária ou concomitante (VAN DER LUGT et al., 2002). Porém alguns autores propõem que as lesões podem ser explicadas por uma injúria axonal primária e que as alterações observadas em corpos de neurônio sejam secundárias e definidas como reação axonal (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; SABATER-VILAR et al., 2004). Um processo de axonopatia distal também tem sido proposto (VAN DER LUGT et al., 1994).

A patogênese das lesões musculares também não está elucidada (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003). Vários mecanismos atuando isoladamente ou em conjunto podem estar envolvidos, como isquemia associada ao decúbito, eventos traumáticos, contrações musculares vigorosas (LORETTI et al., 2003) e síndrome de compartimento (EL-HAGE & LANCASTER, 2004). Tem sido sugerido também que metabólitos de *A. clavatus* possam ter efeitos neurotóxicos e miotóxicos (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003).

As variações no quadro clinicopatológico são atribuídas a diferenças nas micotoxinas produzidas ou nas quantidades das mesmas em diferentes surtos (GILMOUR et al., 1989).

2.5. Lectina-histoquímica

A formação de neurônios cromatolíticos é uma característica comum a diversas doenças de animais e humanos que afetam neurônios motores no tronco encefálico e na medula espinhal (DIVERS et al., 1997; HAHN et al., 2001). Estudos através da técnica de lectina-histoquímica de enfermidades deste grupo são escassos, mas têm demonstrado alterações na glicosilação destes neurônios em casos humanos (CHOU & WANG, 1997). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos e que por isso são amplamente utilizadas para localização histoquímica de resíduos destes compostos em tecidos (SPICER & SCHULTE, 1992; BROOKS et al., 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casos naturais

Os dados epidemiológicos e clínicos dos surtos foram obtidos em visitas às propriedades e junto aos proprietários. No Surto 1 foram necropsiados três bovinos, um já em avançado estado de autólise e dois após eutanásia com tiopental sódico quando moribundos. No Surto 2 foram necropsiados dois bovinos, um imediatamente após a morte e outro após eutanásia com tiopental sódico quando moribundo.

Os dados meteorológicos dos períodos dos surtos foram obtidos em consulta à página do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (www.inmet.com.br).

3.2. Reprodução experimental

O bagaço de malte utilizado nas propriedades onde ocorreram os surtos foi administrado para ovinos por via oral com auxílio de uma seringa descartável de 60ml com a extremidade do cilindro cortada. Foram administradas doses diárias de 40g do bagaço de malte por quilo de peso vivo, seguindo doses utilizadas em trabalhos experimentais já publicados (Kellerman et al., 1976; 1984; Gilmour et al., 1989; Loretto et al., 2003). A administração foi conduzida até o surgimento dos sinais clínicos.

Para reprodução experimental da enfermidade com a cultura de *A. clavatus* em ovinos foram preparados subcultivos do fungo isolado do bagaço de malte utilizado nas propriedades em meio líquido de Lactrimel (vide item 3.3.2). Os meios de cultura com o fungo foram homogeneizados em liquidificador doméstico e administrados por sonda gástrica (sonda nasogástrica para potro). Foi empregada a dose diária de 12ml de meio de cultura por quilo de peso vivo até o surgimento de sinais clínicos claros de intoxicação.

Os animais foram mantidos em baias de alvenaria, com piso de madeira ripado e receberam feno de alfafa e água à vontade. Os ovinos foram inspecionados pelo menos duas vezes ao dia e examinados clinicamente uma vez ao dia, onde foram aferidas a temperatura, frequência respiratória, cardíaca e ruminal, além da coloração das mucosas externas. Foi realizada ainda a coleta de sangue sem anticoagulante através de punção jugular.

3.3. Processamento dos tecidos:

3.3.1. Microscopia, imuno-histoquímica e lectina-histoquímica: Os fragmentos de diversos tecidos destinados à microscopia óptica foram fixados em formol a 10% tamponado, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina e pelos métodos de violeta de cresil e azul rápido de luxol (PROPHET et al., 1992). Do sistema nervoso dos animais foram coletados encéfalo, medula espinhal, gânglios nervosos (trigeminal, espinhais, celíaco e estrelado), fragmentos dos nervos isquiático e fibular. Amostras do sistema nervoso central incluíram cortes da medula oblonga ao nível do óbex, ponte com pedúnculos cerebelares (ao nível do sulco bulbo-pontino), córtex cerebelar (ao nível do corte anterior), mesencéfalo ao nível dos colículos rostrais, tálamo caudal (secção caudal ao corpo mamilar) e cranial (ao nível do quiasma óptico), córtex cerebral nos lobos occipital (ao nível do corte mais caudal do tálamo) e frontal (na altura do sulco cruzado), e medula espinhal ao nível torácico e das intumescências lombar e cervical. A classificação dos núcleos lesados seguiu a descrição neuroanatômica de Yoshikawa (1968) e Johnson et al. (2007). Amostras de músculos dos membros pélvicos (semitendinoso, vasto lateral, vasto medial e gastrocnêmio), membros torácicos (tríceps braquial e subescapular), axiais (longíssimo dorsal e psoas),

respiratórios (intercostal e diafragma) e cardíacos (ventrículos e septo interventricular) dos animais foram mantidas em geladeira (4°C) por cerca de 48 horas antes da fixação em formol para evitar artefatos de contração.

Para realização da técnica de imuno-histoquímica e lectina-histoquímica foram feitos cortes histológicos de áreas selecionadas do sistema nervoso com 5 µm de espessura e estes foram aplicados sobre lâminas de vidro recobertas com solução de gelatina 0,3% e fixados em estufa a 60°C durante 24 horas.

Na imuno-histoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos primários: a) anti-proteína fibrilar glial ácida (anti-GFAP); b) policlonal de coelho anti-neurofilamento bovino H de 200kD (Serotec: AHP245); c) monoclonal anti-proteína príon (VRMD: F99/97). Foi empregado o método da Steptavidina-biotina marcada (LSAB) (Dako, Carpinteria, CA) e como cromógeno foi utilizada a diaminobenzidina (DAB). Todas as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer.

Para realização da técnica de lectina-histoquímica, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela imersão em peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos e a recuperação de glicoconjugados, pela imersão em tampão citrato pH 6,0 em banho-maria por 15 minutos. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado pela imersão em leite desnatado 5% (Molico®). Após o bloqueio com leite desnatado os cortes foram incubados “overnight” a 4°C com as lectinas biotiniladas. Foram utilizadas as seguintes lectinas biotiniladas: *Concanavalian ensiformis* agglutinin (Con A), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *Glycine max* agglutinin (SBA), *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin (RCA), *Ulex europaeus* agglutinin – I (UEA – I), *Triticum vulgare* agglutinin (WGA) (Biotinylated lectin kit I, BK 1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). As diluições das lectinas foram: Con A 1 µg/ml; WGA, SBA e RCA 5 µg/ml; PNA 10 µg/ml; DBA e UEA-I 30 µg/ml. Os cortes foram então incubados com o complexo streptavidina-peroxidase (Dako, Carpinteria, CA) e como cromógeno foi empregada a DAB. Todas as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Como controle negativo de cada bloco foi incubado um corte com tampão sendo omitida a lectina.

3.4. Exames micológicos:

3.4.1. Isolamento e identificação *Aspergillus clavatus*:

Das amostras de bagaço de malte que apresentavam visível contaminação fúngica foram selecionadas áreas identificadas macro e microscopicamente como tendo *A. clavatus*. Micélios e conídios dessas amostras foram inoculados em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (OXOID) acrescido de 0,4g de cloranfenicol (INLAB). A incubação foi realizada num período mínimo de 10 dias a uma temperatura de 25-30°C. Posteriormente os isolados identificados como *A. clavatus* foram repicados através de transferência de micélios e conídeos em Agar Sabouraud para obtenção de cultura pura que foi armazenada em água destilada estéril (técnica de Castellani) (DIOGO et al., 2005). Estas análises foram conduzidas no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.4.2. Subcultivo:

Para reprodução experimental da enfermidade em ovinos foram preparados subcultivos através de inoculação das hifas e conídeos de em meio líquido de Lactrimel (14g de farinha de trigo, 14g de leite em pó, 7g de mel e 0,4g de cloranfenicol / 1l). Imediatamente após inoculação e agitação vigorosa de todos os componentes, o meio líquido inoculado foi distribuído em placas de Petri e incubado por 10 a 15 dias a 25-30°C para obtenção de uma densa e uniforme camada de *A. clavatus*. Após o período de incubação foram realizadas novas observações de caracteres macro e micromorfológicos para verificação da pureza do inóculo. Estas análises foram também conduzidas no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

3.4.3. Análise da patulina:

Para pesquisa de patulina foram enviadas ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas (Lamic) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) amostras do bagaço de malte utilizado na propriedade 1 e placas de Petri com a cultura de *A. clavatus* em meio líquido Lactrimel utilizadas na reprodução experimental do Ovino 3. A pesquisa de patulina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por ultravioleta (HPLC/UV).

4. RESULTADOS

4.1. Casos naturais

4.1.1. Dados epidemiológicos

Os surtos ocorreram em março e abril de 2006 (Propriedade 1) e em janeiro e fevereiro de 2007 (Propriedade 2) nos bairros de Branquinha e Itapuã, respectivamente, ambos no município de Viamão, Rio Grande do Sul.

Na Propriedade 1 os sinais clínicos foram observados cerca de uma semana após o recebimento de nova carga de bagaço de malte, que foi colocada sobre as sobras da carga anterior, recebida 28 dias antes. Os animais passaram a receber um mistura de ambas. O proprietário notou surgimento de um bolor esverdeado ou acinzentado sobre o bagaço de malte. Desse bolor foi isolado *Aspergillus clavatus* (Figura 2 A, B). O uso do subproduto foi suspenso cerca de três dias após serem notados os primeiros sinais clínicos nos bovinos. No entanto, um animal ainda adoeceu cerca de dez dias após a suspensão. Na propriedade eram utilizados cerca de 25 kg de bagaço de malte por animal por dia. Duas das três vacas que adoeceram eram das de melhor produção (cerca de 40kg leite/dia).

O bagaço de malte utilizado na Propriedade 2 apresentou, segundo o proprietário, um bolor azul esverdeado na superfície 4 a 5 dias após a entrega. Os primeiros sinais clínicos no primeiro animal afetado foram percebidos 12 dias após entrega do material, ou seja, cerca de 7 dias após a observação do bolor. Esta primeira carga do subproduto foi empregada na alimentação dos animais até 28 dias após entrega. Uma nova carga do subproduto foi recebida no dia seguinte ao término e colocada no mesmo reservatório, apresentando um bolor semelhante ao descrito em poucos dias. Cinco dias após a entrega dessa, durante a primeira visita a propriedade, praticamente toda a superfície do subproduto estava recoberta pelo bolor azul esverdeado com áreas brancas e pretas. Do bolor foi isolado *A. clavatus* com pequena contaminação por *Rhizopus* sp. (Figura 2 C, D). O uso do subproduto havia sido suspenso no dia anterior à visita. Assim os animais ingeriram o subproduto por cerca de 28 dias após a observação do bolor (24 dias da primeira carga e 4 dias da segunda carga) e cerca de 21 dias após os primeiros sinais clínicos. Eram utilizados cerca de 8 kg de bagaço de malte por animal por dia e não ocorreram novos casos. Há um ano o subproduto era empregado na alimentação do rebanho sem que houvesse problemas.

A morbidade de ambos os surtos foi semelhante, em torno de 30%. Na Propriedade 1 de um total de 10 bovinos que recebiam o bagaço de malte 3 adoeceram (30%), enquanto que na Propriedade 2 de 33 bovinos, 10 adoeceram (30,3%). A letalidade na Propriedade 1 foi de 100%, enquanto que na Propriedade 2 foi de 50%. Os



FIGURA 2 – Propriedades onde ocorreram os surtos de neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. **A.** Reservatório do bagaço de malte da propriedade 1; **B.** Bagaço de malte da propriedade 2 cerca de 2 semanas após suspensão do uso, onde ainda nota-se bolor esverdeado ou acinzentado; **C.** Reservatório do bagaço de malte da propriedade 2; **D.** Bagaço de malte com abundante bolor azul esverdeado na superfície.

dados dos animais dos surtos, assim como evolução e desfecho, são apresentados na Tabela 1. A evolução clínica variou de 10 a 16 dias (Propriedade 1) e 5 a 64 dias (Propriedade 2). Dos animais que recuperaram na propriedade 2 apenas em um, que apresentou sinais mais graves, havia seqüelas locomotoras leves até 133 dias após o início dos sinais. Os demais não apresentavam sinais perceptíveis após 117 dias após o início dos sinais.

Tabela 1 - Neurotoxicose associada à ingestão de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. Dados dos animais dos surtos e do experimento, com evolução clínica e desfecho.

| Bovinos | Dados dos bovinos | Evolução clínica | Desfecho |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|---|
| <i>Propriedade 1</i> | | | |
| 1 | Bovino, HPB, fêmea, 7 anos | NI | Óbito com necropsia |
| 2 | Bovino, HPB, fêmea, 5 anos | 16 dias | Eutanásia e necropsia |
| 3 | Bovino, HPB, fêmea, 4 anos | ±10 dias | Eutanásia e necropsia |
| <i>Propriedade 2</i> | | | |
| 4 | Bovino, HPB, fêmea, 5 anos | 5 dias | Óbito com necropsia |
| 5 | Bovino, HPB, macho, 1,3 ano | 22dias | Eutanásia e necropsia |
| 6 | Bovino, HPB, macho, 8 meses | NI | Adoeceu levemente e recuperou-se |
| 7 | Bovino, HPB, fêmea, 2,5 anos | 64 dias | Óbito sem necropsia |
| 8 | Bovino, HPB, fêmea, 2 anos | 5 dias | Óbito sem necropsia |
| 9 | Bovino, HPB, fêmea, 2 anos | 133 dias | Adoeceu moderadamente e seqüelas leves ² |
| 10 | Bovino, HPB, macho, terneiro | 5 dias | Óbito sem necropsia |
| 11 | Bovino, HPB, fêmea, 2 anos | 6 dias ¹ | Adoeceu levemente e recuperou-se |
| 12 | Bovino, HPB, fêmea, 2 anos | 6 dias ¹ | Adoeceu levemente e recuperou-se |
| 13 | Bovino, HPB, fêmea, 2,5 anos | 6 dias ¹ | Adoeceu levemente e recuperou-se |

¹ Observação de sinais em visita a propriedade, porém sem sinais clínicos aparentes na última visita (117 dias após início dos sinais); ² Óbito por distocia quando apresentava seqüelas leves dos sinais locomotores; HPB: holandesa preta e branca; NI: não informado.

As temperaturas médias das propriedades nos períodos dos surtos foram de cerca de 21°C (Propriedade 1) e 26°C (Propriedade 2).

4.1.2. Dados clínicos

Os sinais clínicos em ambos os surtos eram predominantemente locomotores e incluíam mais comumente fraqueza muscular e incoordenação principalmente dos membros pélvicos, tremores musculares nos flancos e membros, e relutância em se movimentar. Inicialmente os sinais não eram muito perceptíveis se os animais estavam em repouso. No entanto, quando movimentados os tremores musculares e fraqueza muscular tornavam-se mais evidentes. Os tremores eram mais acentuados nos bovinos da Propriedade 1. Com a evolução havia extrema dificuldade de permanecer em estação, permanecendo poucos momentos com os membros pélvicos deslocados cranialmente e os membros torácicos deslocados caudalmente (Figura 3). Os bovinos quando forçados a caminhar demonstravam fraqueza muscular, incoordenação e hipermetria predominantemente nos membros pélvicos. Com frequência o caminhar era trôpego e apoiado sobre os boletos dos membros pélvicos (Figura 4 C, D), com quedas ocasionais, após as quais estes relutavam por alguns minutos em sair do decúbito esternal. Nos animais que evoluíram para o óbito ou foram eutanasiados, esses quadros clínicos progrediam para decúbito esternal permanente, embora permanecessem alertas, com apetite e dipsia relativamente normais até próximo da morte ou eutanásia (Figura 4 A). Nas fases terminais os animais permaneciam em decúbito lateral, com movimentos de pedalagem e em poucos casos opistótono (Figura 4 B). Os animais apresentavam ainda hiperestesia demonstrada por respostas exageradas ao toque e aos estímulos sonoros, e eram mais irritadiços (sinais mais relatados e observados na propriedade 2). Na Propriedade 1 um animal demonstrou adicionalmente clara relutância em transpor pequenos obstáculos e intensificação dos tremores quando em decúbito lateral (Bovino 2). Na propriedade 2 um animal apresentou ainda moderada taquipnéia e dispnéia após breve movimentação (Bovino 9). Quando testada, a sensibilidade cutânea estava diminuída ou ausente principalmente nas porções posteriores do corpo (Bovinos 2, 3 e 4). Foi relatada também em ambas propriedades marcada queda na produção dos animais em lactação (na Propriedade 2, onde foi mensurada, a queda chegou a 47,2% no

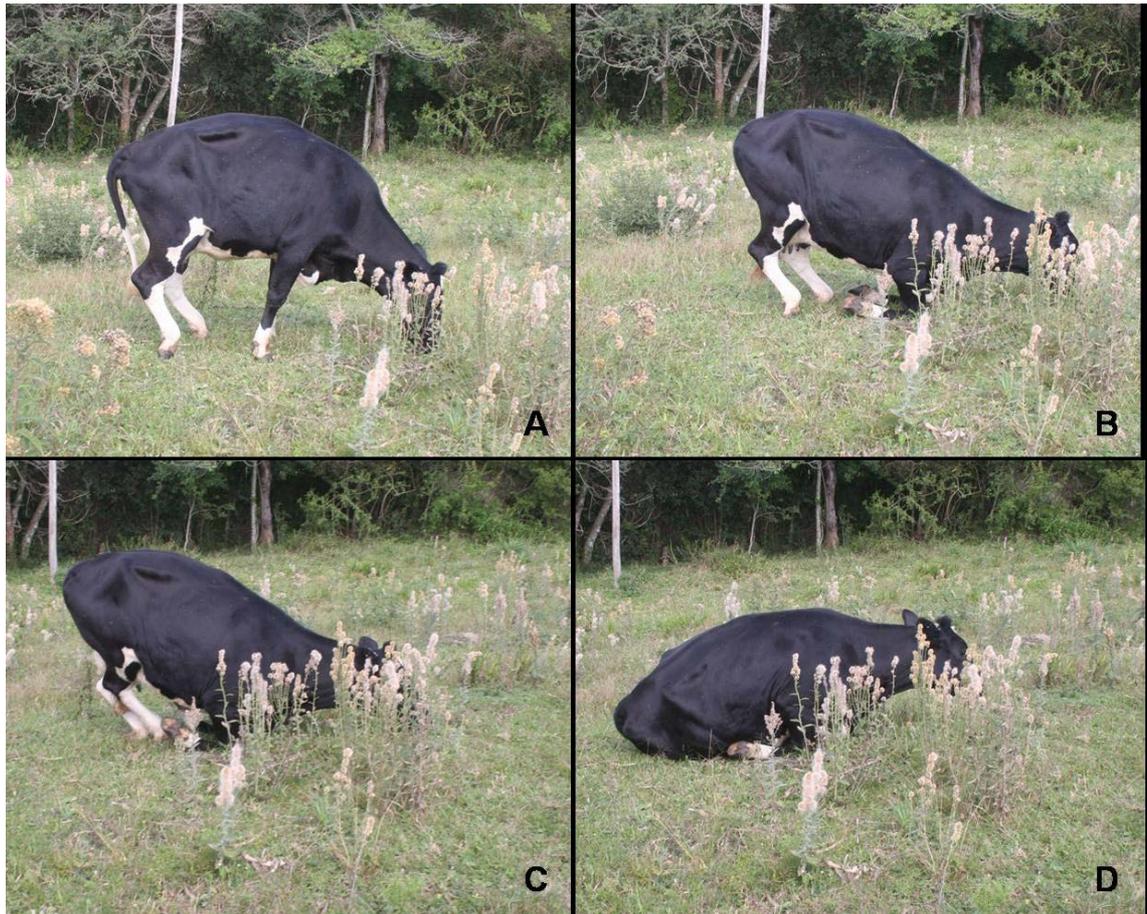


FIGURA 3 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 3. **A.** Fraqueza muscular nos membros pélvicos com deslocamento do apoio para os membros torácicos. **B, C, D.** A movimentação é seguida de queda.



FIGURA 4 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. **A.** Bovino 2. Decúbito permanente. **B.** Bovino 3. Decúbito lateral, opistótono e movimentos de pedalagem. **C, D.** Bovino 9. Animal caminhando sobre os boletos dos membros pélvicos.

auge do surto) e caquexia nos bovinos de evolução mais longa.

4.1.3. Macroscopia

As lesões macroscópicas, quando presentes, foram observadas nos músculos esqueléticos dos membros pélvicos e torácicos. No Bovino 2, estas estavam claramente presentes e se caracterizavam por áreas esbranquiçadas focalmente extensas, opacas e arenosas com frequência próximas a inserções dos músculos, contrastando com áreas de coloração normal vizinhas (Figura 5). Nos membros pélvicos estas alterações foram observadas nos músculos quadríceps (vasto intermédio e lateral), semitendíneo, gastrocnêmio, sóleo e fibular terceiro. Já nos membros torácicos, nos músculos tríceps e subescapular. Adicionalmente, havia leve edema gelatinoso e translúcido entre as fáscias musculares. No Bovino 3 havia apenas palidez difusa e leve em músculos dos membros pélvicos e nos Bovinos 1, 4, 5 e nos ovinos do experimento não foram observadas lesões macroscópicas significativas.

4.1.4. Microscopia

Os principais achados histológicos nos bovinos foram lesões degenerativas e necróticas em neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal, de núcleos específicos da medula oblonga, ponte, mesencéfalo e tálamo, além de gânglios nervosos espinhal, trigêmeo, estrelado e celíaco. As lesões eram bilaterais e relativamente simétricas. Os núcleos nervosos do tronco cerebral mais consistentemente afetados foram o vermelho (rubro), formação reticular da ponte, motor dorsal do nervo vago e ambíguo (Tabela 2). Não foram observadas lesões nos plexos mioentéricos e submucosais nos cortes de intestino dos animais deste estudo.

Os neurônios afetados apresentavam-se tumefeitos, arredondados, com citoplasma eosinofílico, homogêneo e pálido, particularmente na porção central do pericário, e com grânulos de Nissl rarefeitos dispostos numa fina camada na periferia da célula ou praticamente ausentes. Os núcleos dos neurônios afetados, quando presentes no plano de corte do pericário, eram, com frequência, periféricos e apresentavam-se como que rechaçados contra a membrana celular, com picnose ou cariorrexia (Figura 6 A, B).



FIGURA 5 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 2. Músculo quadríceps femoral. Área amarelada, opaca e focal bem delimitada.

Tabela 2 - Neurotoxicose associada à ingestão de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. Áreas e estruturas do sistema nervoso com lesões microscópicas nos bovinos dos casos espontâneos e suas respectivas intensidades.

| Áreas ou estruturas do sistema nervoso com lesões | Bovino 2 | Bovino 3 | Bovino 4 | Bovino 5 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Intumescência lombar</i> | | | | |
| Corno ventral | ++ | ++ | + | + |
| Corno dorsal | + | + | + | 0 |
| <i>Intumescência cervical</i> | | | | |
| Corno ventral | 0 | + | + | + |
| Corno dorsal | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Medula torácica</i> | | | | |
| Corno ventral | 0 | + | + | 0 |
| Corno dorsal | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bulbo ao nível do óbex</i> | | | | |
| Núcleo motor dorsal do vago | ++ | ++ | ++ | + |
| Núcleo ambíguo | 0 | + | ++ | + |
| <i>Ponte</i> | | | | |
| Formação reticular | 0 | ++ | + | + |
| <i>Tálamo caudal ao corpo mamilar</i> | | | | |
| Núcleo vermelho | +++ | +++ | ++ | + |
| <i>Gânglio trigeminal</i> | +++ | +++ | +++ | ++ |
| <i>Gânglio celíaco</i> | 0 | - | ++ | - |
| <i>Gânglio espinhal</i> | +++ | +++ | +++ | ++ |
| <i>Gânglio estrelado</i> | - | - | ++ | ++ |
| <i>Nervo isquiádico</i> | 0 | 0 | 0 | ++ |
| <i>Nervo fibular</i> | - | - | + | ++ |

Intensidade das lesões: (+) leve (1 a 5 neurônios cromatolíticos); (++) moderada (6 a 10 neurônios cromatolíticos); (+++) acentuada (mais que 10 neurônios cromatolíticos); (0) sem alterações; (-) não pesquisado; nos nervos as cruces se referem à intensidade das lesões axonais.

Ocasionalmente esses neurônios cromatolíticos apresentavam vacúolos citoplasmáticos claros bem delimitados e de diferentes tamanhos. Na formação reticular da ponte do Bovino 5 alguns neurônios apresentavam citoplasma eosinofílico parcialmente fragmentado, margeado ou entremeado por células microgлияis (neuronofagia) (Figura 6 C, D), além de discretos aglomerados de células da glia e manguitos perivasculares linfocitário.

Nos gânglios espinhais (Bovinos 2, 3 e 5), associados as lesões regressivas em neurônios, havia também fragmentação de neurônios com infiltração de macrófagos

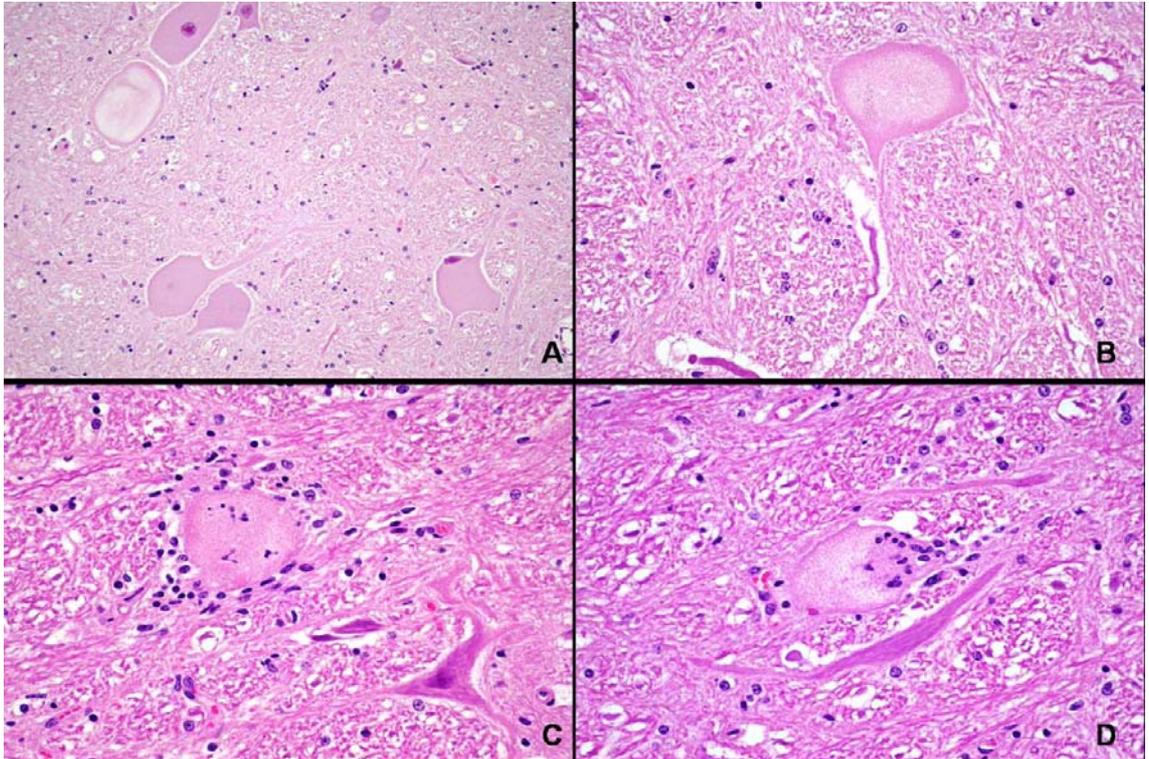


FIGURA 6 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 5. **A.** Núcleo ambíguo. Neurônios tumefeitos apresentando cromatólise total, com aumento da eosinofilia citoplasmática, núcleos ausentes ou com picnose e deslocamento do núcleo para periferia do pericário. Um neurônio apresenta marcada dissolução da porção central do pericário. Hematoxilina e eosina (HE), Obj. 20; **B.** Núcleo ambíguo. Visão aproximada de neurônio com cromatólise total, núcleo ausente e citoplasma com aumento da eosinofilia periférica e palidez central. HE, Obj. 40; **C.** Formação reticular da ponte. Corpo do neurônio necrótico com marginação e infiltração de microglia (neuronofagia). HE, Obj. 40; **D.** Formação reticular da ponte. Neuronofagia. HE, Obj. 40.

(neuronofagia) (Figura 7), com aumento na celularidade ao redor de neurônios (satelitose) e preenchimento celular de locais antes ocupados por neurônios (provavelmente aglomerados de células satélites, os chamados nódulos de Nageotte) (Figura 8).

Nos funículos dorsais da medula espinhal (Bovino 5) e nos nervos isquiáticos (Bovino 5) e fibulares (Bovinos 4 e 5) havia tumefação ou ausência de axônios, associados a dilatação da bainha de mielina e ocasionais macrófagos com citoplasma abundante e vacuolizado (câmaras de digestão). A imunomarcação de neurofilamento H associada ao azul rápido de luxol ressaltou os axônios tumefeitos e a conseqüente perda de mielina, respectivamente (Figura 9). Alguns macrófagos associados às lesões axonais apresentaram no citoplasma marcação para neurofilamento e coloração pelo azul rápido de luxol. A imunomarcação do neurofilamento foi observada apenas em axônios do sistema nervoso central e nervos periféricos, não sendo notada marcação no pericário de neurônios cromatólíticos. Não foi evidenciado aumento na imunomarcação da GFAP em astrócitos das áreas contendo neurônios cromatólíticos. A imuno-histoquímica para PrP nestes animais foi consistentemente negativa.

As lectinas *Concanavalin ensiformis* (Con A) (Figura 10) e a *Triticum vulgaris* (WGA) (Figura 11) apresentaram uma marcação forte e homogênea no pericário dos neurônios cromatólíticos com intensidade que variou de moderada a acentuada. A lectina *Ricinus communis* (RCA) também apresentou uma leve marcação homogênea central em pequeno número de neurônios cromatólíticos. As lectinas WGA e RCA apresentaram ocasionais marcações granulares leves e dispersas no pericário de neurônios não cromatólíticos. As lectinas *Dolichos biflorus* (DBA), *Glycine max* (SBA), *Arachis hypogaea* (PNA) e *Ulex europaeus* agglutinin – I (UEA – I) não apresentaram marcações em neurônios. As lectinas *Glycine max* (SBA), RCA e WGA apresentaram forte marcação nos vasos sanguíneos.

Vacúolos de diferentes tamanhos e bem definidos, por vezes ocupando boa parte do citoplasma dos neurônios, foram ocasionalmente observados em neurônios sem outras alterações evidentes nos gânglios espinhais e trigeminal de bovinos e ovinos, além de neurônios do núcleo vermelho de um bovino. Foi observado no Bovino 2 vacuolização do neurópilo na região da substância negra (nigra).

Os principais achados histopatológicos nos músculos esqueléticos dos animais constam na Tabela 3. Como visto nesta tabela, mesmo animais sem lesões macroscópicas aparentes apresentavam lesões musculares, embora em geral menos

intensas, em alguns músculos na microscopia. As lesões se caracterizavam por vacuolização intracitoplasmática, tumefação segmentar de miofibras, com aumento da eosinofilia e perda das estriações (necrose hialina) ou fragmentação (necrose flocular). Estas lesões estavam ocasionalmente associadas a mineralização e/ou entremeada por fibrose e tentativas de regeneração (Figura 12). A mineralização era observada na forma de pequenas concreções basofílicas dispersas entre as miofibrilas de segmentos adjacentes a necrose (lembrando a distribuição das mitocôndrias) e dentro de segmentos necróticos ou de forma difusa nestes últimos. A mineralização foi observada quase exclusivamente no Bovino 2, porém mesmo neste não estava presente em todas as amostras avaliadas. No Bovino 5 havia ainda degeneração walleriana em parte dos ramos nervosos entremeados as miofibras em alguns músculos avaliados (diafragma,

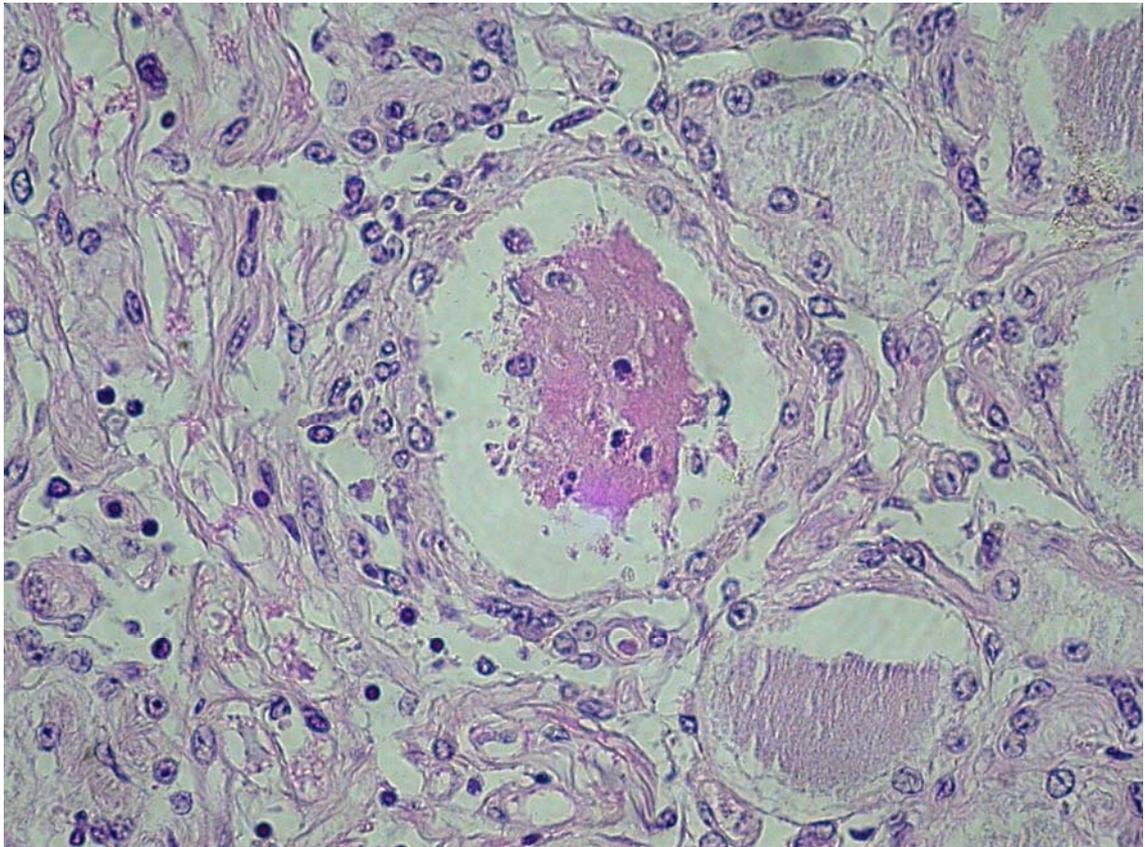


FIGURA 7 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 4. Gânglio espinhal. Fragmentação do corpo do neurônio necrótico com infiltração macrófagos (neuronofagia). Hematoxilina e eosina, Obj. 40.

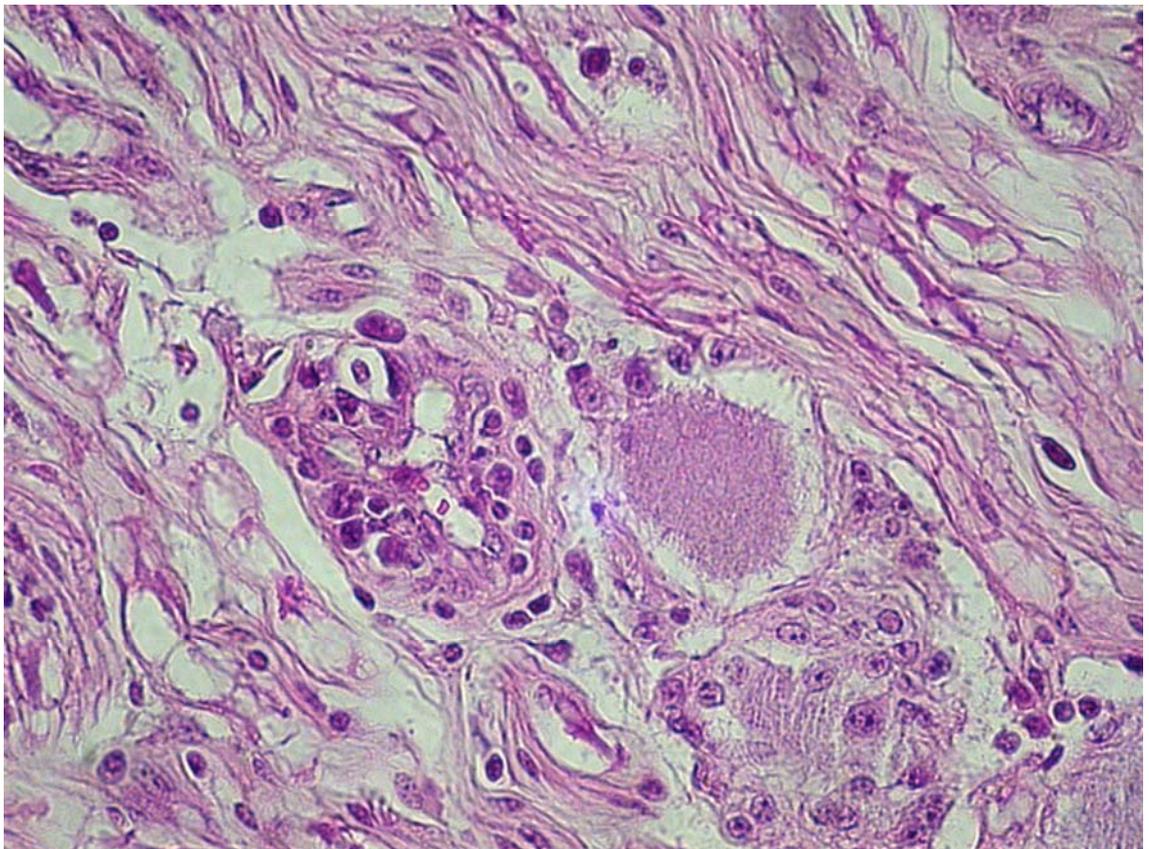


FIGURA 8 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 2. Gânglio espinhal. Preenchimento celular de locais provavelmente antes ocupados por neurônios (nódulos de Nageotte). Hematoxilina e eosina, Obj. 40.

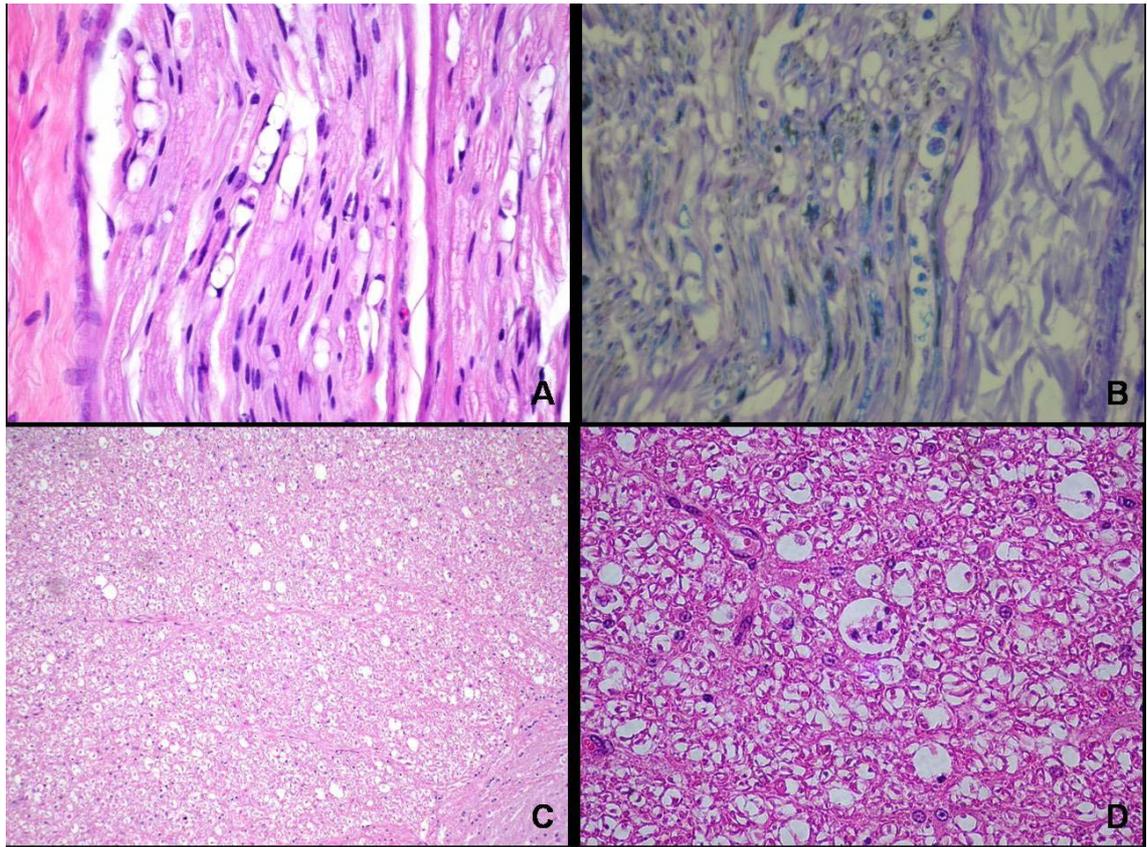


FIGURA 9 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 5. **A**, **B**. Nervo fibular. **A**. Fragmentação e perda de axônios e vacuolização indicando a perda de mielina. Hematoxilina e eosina (HE), Obj. 40; **B**. Fragmentação e perda de axônios, com desmielinização e infiltração de macrófagos com citoplasma azulado indicando a fagocitose de mielina (câmaras de digestão). Imuno-histoquímica para neurofilamento (Método streptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno diaminobenzidina, contra-corado pelo azul rápido de luxol). Obj. 40; **C**, **D**. Medula espinhal. **C**. Perda de axônios e vacuolização da substância branca da medula espinhal. HE., Obj. 20; **D**. Infiltração de macrófagos e formação de digestão. HE, Obj. 40.

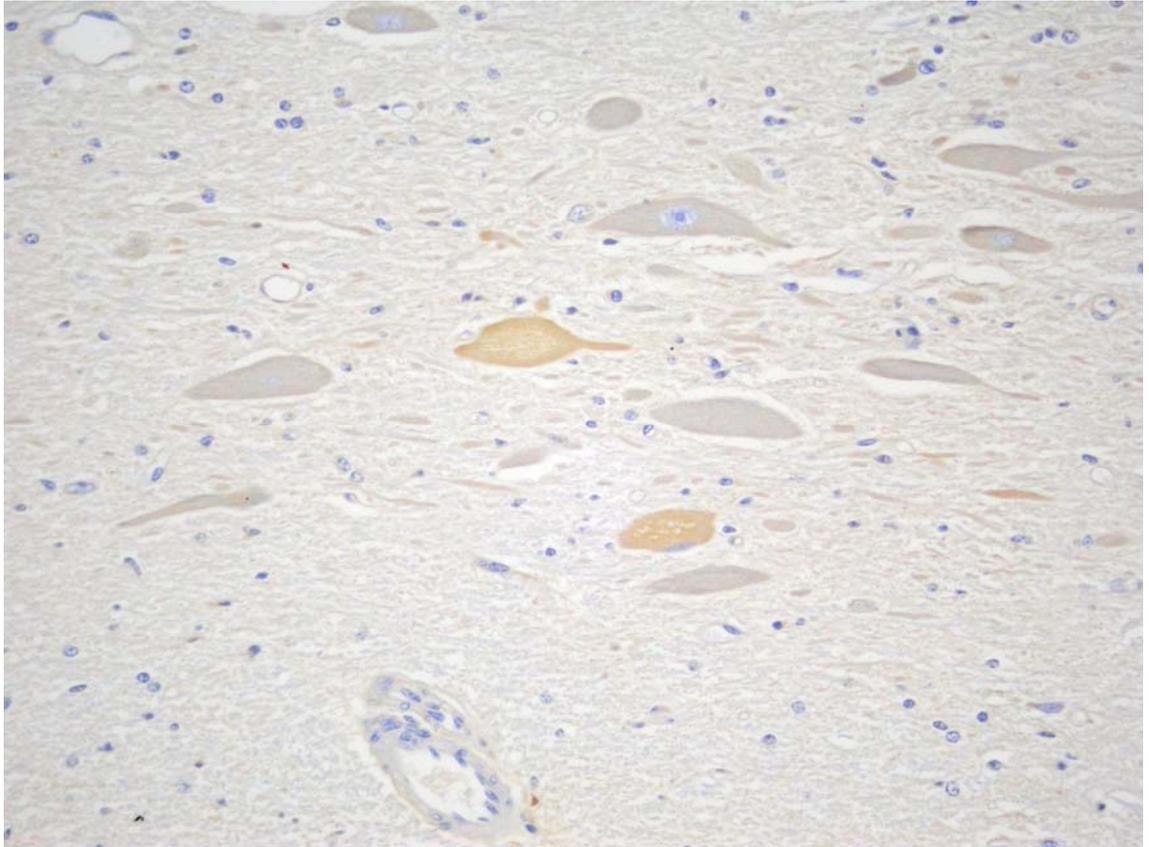


FIGURA 10 – Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 4. Medula oblonga ao nível do óbex. Núcleo motor dorsal do nervo vago. Dois neurônios marcados com a lectina *Concanavalian ensiformis* (Con A), num dos quais nota-se ainda o núcleo rechaçado na periferia. Outros neurônios adjacentes são negativos. Método streptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno diaminobenzidina, contra-corado pela hematoxilina. Obj. 40.

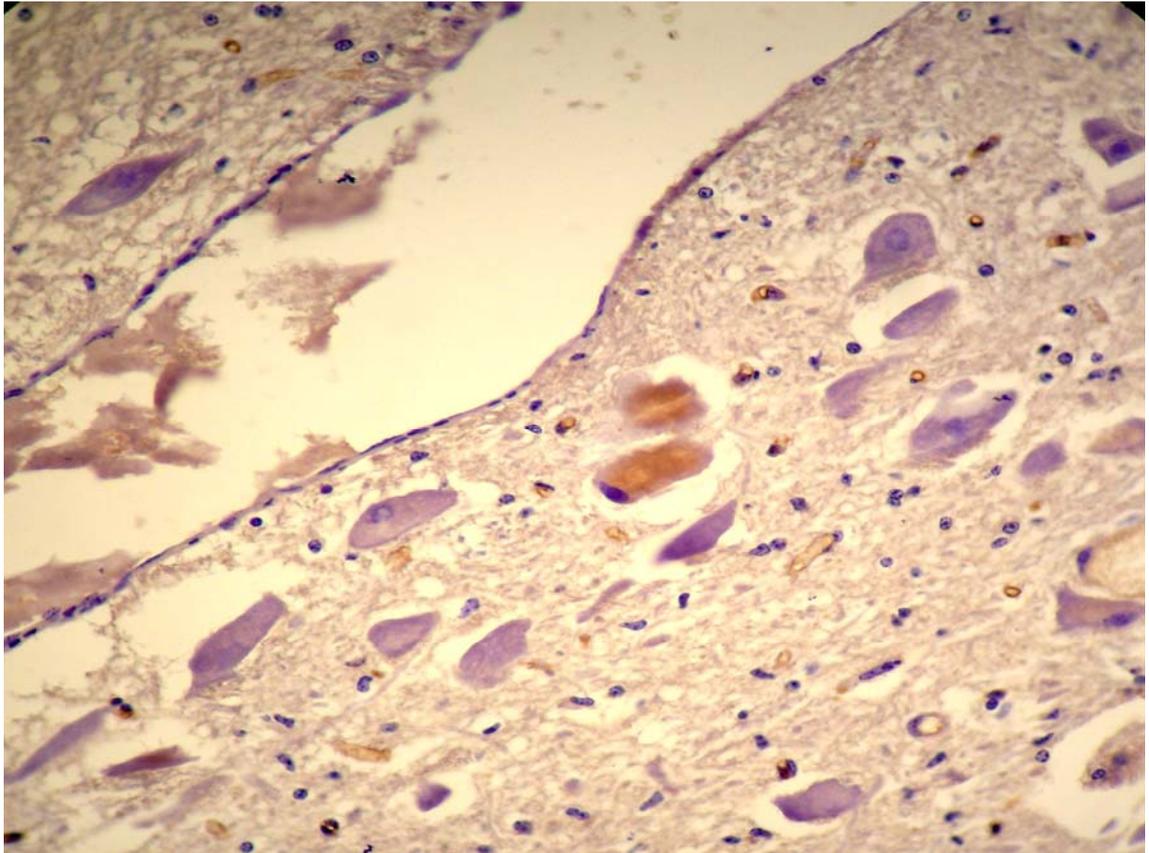


Figura 11 – Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 2. Medula oblonga ao nível do óbex. Núcleo motor dorsal do nervo vago. Dois neurônios marcados com a lectina *Triticum vulgaris* (WGA), num dos quais nota-se ainda o núcleo rechaçado na periferia. Outros neurônios adjacentes são negativos. Observe que a WGA reconhece também glicoproteínas do endotélio. Método streptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno diaminobenzidina, contra-corado pela hematoxilina. Obj. 40.

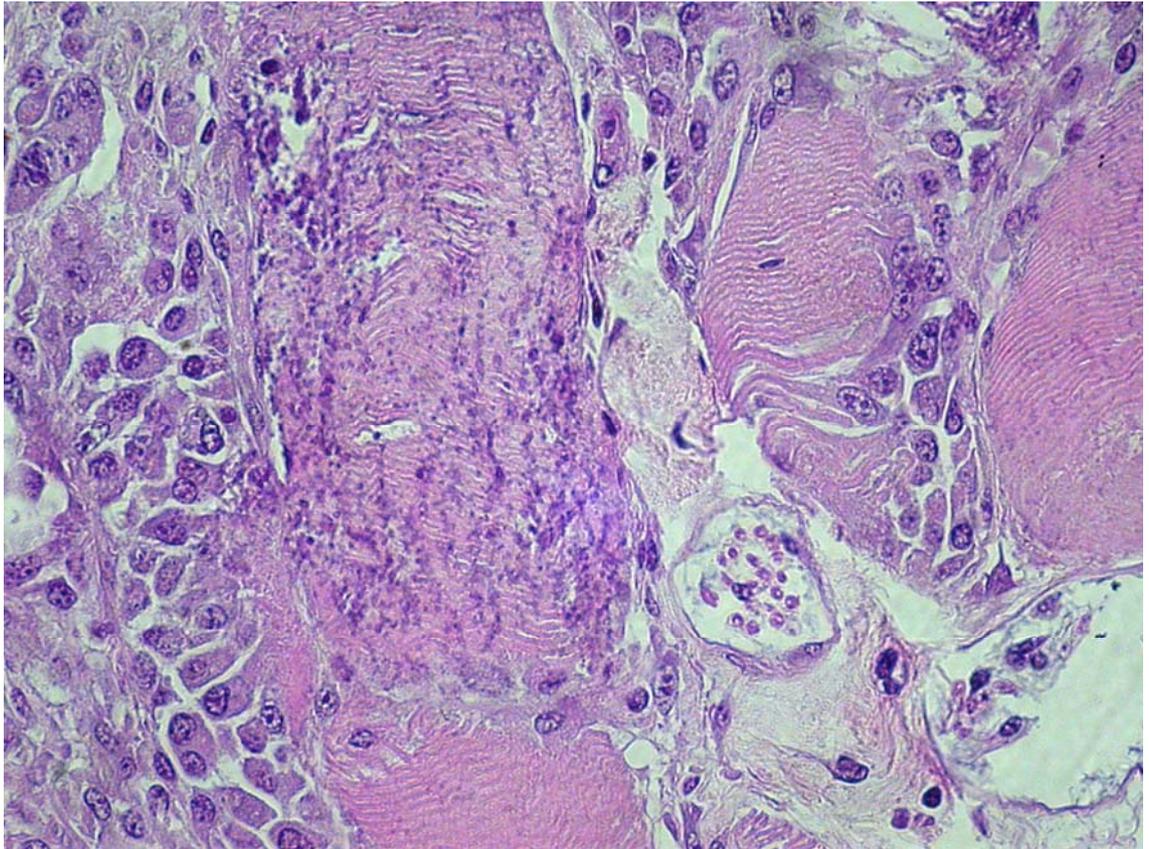


FIGURA 12 - Neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Bovino 2. Músculo quadríceps femoral. Mineralização de segmento de miofibra na forma de pontilhado basofílico e invasão de segmentos necróticos por macrófagos e células satélites, com ocasional formação de células multinucleadas. Hematoxilina e eosina, Obj. 40.

longíssimo dorsal, subescapular e vasto medial). Não foram observadas lesões nas miofibras das áreas avaliadas do miocárdio, diafragma e músculos intercostais. Como achado incidental havia leve a moderada infestação por *Sarcocystis* sp. em praticamente todas as amostras avaliadas.

Tabela 3 - Neurotoxicose associada à ingestão de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus* em bovinos. Músculos com lesões nos Bovinos 2 a 5 dos casos naturais.

| Lesões/ Músculos / Bovinos | | Vacúolos | Necrose | Regeneração e fibrose | Mineraliza ção | Lesão axonal¹ |
|---|---|-----------------|----------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Semitendinoso | 2 | + | ++ | ++ | +++ | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | - | - | - | - | - |
| Vasto lateral | 2 | + | + | 0 | + | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | +++ | +++ | ++ | 0 |
| | 5 | - | - | - | - | - |
| Vasto medial | 2 | ++ | ++ | +++ | +++ | 0 |
| | 3 | + | ++ | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | + | 0 | 0 | + |
| Gastrocnêmio | 2 | + | ++ | +++ | +++ | 0 |
| | 3 | - | - | - | - | - |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | + | + | 0 | 0 | 0 |
| Tríceps braquial | 2 | + | +++ | ++ | 0 | 0 |
| | 3 | - | - | - | - | - |
| | 4 | 0 | + | + | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Subescapular | 2 | ++ | ++ | +++ | +++ | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | ++ | + | 0 | 0 |
| | 5 | + | + | ++ | 0 | + |
| Longíssimo dorsal | 2 | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | + | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| Psoas | 2 | 0 | + | + | 0 | 0 |
| | 3 | + | ++ | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | ++ | + | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | + | 0 | 0 | 0 |

¹Degeneração walleriana em axônios de ramos nervosos entre fibras musculares. Intensidade das lesões: (0) ausente; (+) leve; (++) moderada; (+++) acentuada; e (-) não pesquisado.

4.1.5. Micologia e análise de patulina

Os fungos presentes nas amostras do bagaço de malte de ambas propriedades e nos cultivos foram identificados como *A. clavatus* pelas características macro e micromorfológicas. Nas amostras da Propriedade 2, além deste, houve pequena contaminação por *Rhizopus* sp. As colônias de *A. clavatus* apresentavam aspecto granular, coloração azul esverdeada e, microscopicamente, conidióforos medindo de 3 a 4µm com típicas vesículas em forma de clava, inteiramente recobertas por fiálides curtos e conídios azul esverdeados (Figura 13).

A pesquisa de patulina foi negativa nas amostras do bagaço de malte da Propriedade 1 e em meios de cultura utilizados na reprodução experimental no Ovino 3.

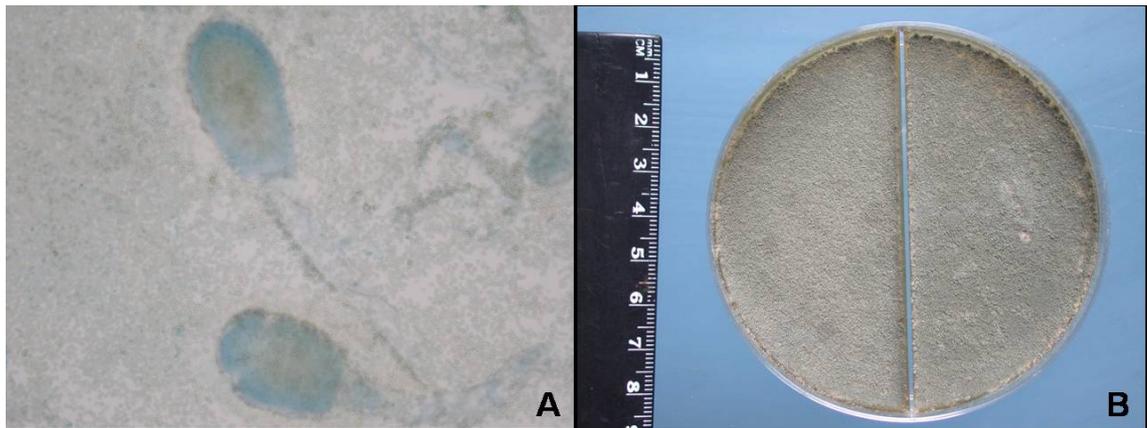


FIGURA 13 - *Aspergillus clavatus*. A. Bagaço de malte da propriedade 2. Aspectos microscópicos do típico do fungo, como vesícula em forma clava recoberta por fiálides curtos (azul mais intenso) e grande número de conídios aderidos às fiálides ou destacados. Lactofenol azul de algodão, obj.100; B. Aspectos macroscópicos da cultura.

4.2. Reprodução experimental em ovinos

4.2.1. Delineamento experimental e dados clínicos

Na Tabela 4 constam o delineamento experimental, o início e a evolução do quadro clínico, e o desfecho dos casos.

Tabela 4 – Delineamento experimental e principais dados da intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos.

| Ovinos | Dose diária | Número de administrações | Dose total | Observação de sinais após 1 ^a administração | Evolução clínica | Desfecho |
|----------------|-------------|--------------------------|------------|--|------------------|------------------------|
| 1 ^a | 40g/kg | 3 | 120g/kg | 51 horas | 39 horas | morte |
| 2 ^a | 40g/kg | 2 | 60g/kg | 51 horas | 67 horas | morte |
| 3 ^b | 12ml/kg | 6 | 72ml/kg | 72 horas | 72 horas | eutanásia ^e |
| 4 ^c | 40g/kg | 19 | 760g/kg | 147 horas | 288 horas | eutanásia ^e |
| 5 ^d | 12ml/kg | 6 | 72ml/kg | 72 horas | 96 horas | morte |
| 6 ^d | 12ml/kg | 4 | 48ml/kg | 72 horas | 37 horas | morte |
| 7 ^d | 12ml/kg | 4 | 48ml/kg | 72 horas | 96 horas | recuperou ^f |

^a Experimento com bagaço de malte oriundo da propriedade 1; ^b Experimento com culturas de *A. clavatus* em meio lactrimel líquido [isolado do surto descrito por Loretti et al. (2003)]; ^c Experimento com bagaço de malte oriundo da Propriedade 2; ^d Experimento com culturas de *A. clavatus* em meio lactrimel líquido (isolado do bagaço de malte da Propriedade 2). ^e eutanásia com barbitúricos; ^f eutanásia com barbitúricos dois dias após recuperação clínica.

Os sinais clínicos de todos os ovinos da reprodução experimental foram predominantemente locomotores, os quais, à exceção do Ovino 4, eram acrescidos de sinais respiratórios. Os sinais locomotores incluíam tremores musculares de intensidade crescente, hiperestesia ao toque e ao som, caminhar com passos curtos, com membros pélvicos afastados, rígidos e dando pequenos saltos. Os ovinos ficavam sempre atentos ao ambiente com orelhas eretas. Inicialmente os tremores e a hiperestesia eram pouco perceptíveis, especialmente quando os animais estavam em repouso. A movimentação espontânea ou forçada tornava esses sinais mais intensos e, com a progressão da doença, ocasionalmente levava ao decúbito. A manutenção da cabeça do animal erguida, por cerca de um minuto, também causava efeito semelhante, quando esta era solta subitamente (Teste HR ou “head raising test”). Após períodos variáveis de repouso, os animais ficavam novamente em estação, mas com dificuldade que aumentava progressivamente.

Nas fases finais, os ovinos apresentavam grande dificuldade de manter a estação e permaneciam a maior parte do tempo em decúbito esternal. Quando em estação, os membros pélvicos eram deslocados cranialmente e freqüentemente afastados; os membros torácicos eram aproximados, deslocados caudalmente e trêmulos; enquanto a cabeça permanecia abaixo da linha do corpo. Os animais demonstravam progressiva fraqueza muscular nos membros pélvicos, deslocando o apoio para os membros torácicos (Figura 11 A, C). O Ovino 4, nesta fase da doença ocasionalmente apoiava-se sobre os boletos dos membros pélvicos.

Exceto pelo ovino 4, nos demais, a freqüência respiratória aumentou progressivamente e evoluiu para respiração com narinas dilatadas e, posteriormente, ofegante com a boca aberta e a língua exposta (Figura 11 B, D). O apetite permaneceu nesses ovinos até próximo da morte ou eutanásia. O Ovino 4, entretanto, apresentou anorexia e apatia com a progressão da doença clínica. A temperatura corporal do Ovino 3 ultrapassou os 42°C próximo da morte. Os movimentos ruminais, a freqüência cardíaca e o tônus da língua dos animais não apresentaram alterações significativas durante o período de experimento.

4.2.2. Macroscopia e microscopia

Não havia alterações significativas nas necropsias. Os achados histológicos dos ovinos foram em grande parte semelhantes aos observados nos bovinos dos casos naturais e caracterizados por lesões degenerativas e necróticas em neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal, de núcleos específicos da medula oblonga, ponte, mesencéfalo e tálamo, além de gânglios nervosos espinhal, trigêmio, estrelado e celíaco (Tabela 5). As lesões neuronais dos ovinos foram semelhantes às dos bovinos, porém a tumefação celular e as alterações nucleares regressivas não foram alterações proeminentes. Além da rarefação central dos grânulos de Nissl, alguns neurônios afetados apresentavam a rarefação na periferia do pericário (cromatólise periférica). Outros neurônios apresentavam-se retraídos e com aumento da eosinofilia citoplasmática e picnose (Figura 12). Também nos ovinos não foram observadas lesões nos plexos mioentéricos e submucosais nos cortes de intestino.

A imunomarcção do neurofilamento foi observada apenas em axônios do sistema nervoso central e nervos periféricos, não sendo notada marcação no pericário de neurônios cromatolíticos. Não foi evidenciado aumento na imunomarcção da GFAP

em astrócitos das áreas contendo neurônios cromatolíticos. A imuno-histoquímica para PrP nestes animais foi consistentemente negativa.

Nos ovinos havia necrose hialina e flocular, segmentar e aguda nos músculos semitendinoso (Ovino 3), vasto lateral (Ovino 3), vasto medial (Ovinos 1 e 3), gastrocnêmio (Ovinos 3 e 4), tríceps braquial (Ovino 4) e subescapular (Ovinos 1, 3 e 4). Estas lesões foram leves em todos os animais afetados a exceção do ovino 3 onde eram moderadas. Os demais ovinos não apresentavam lesões em nenhum dos músculos avaliados.

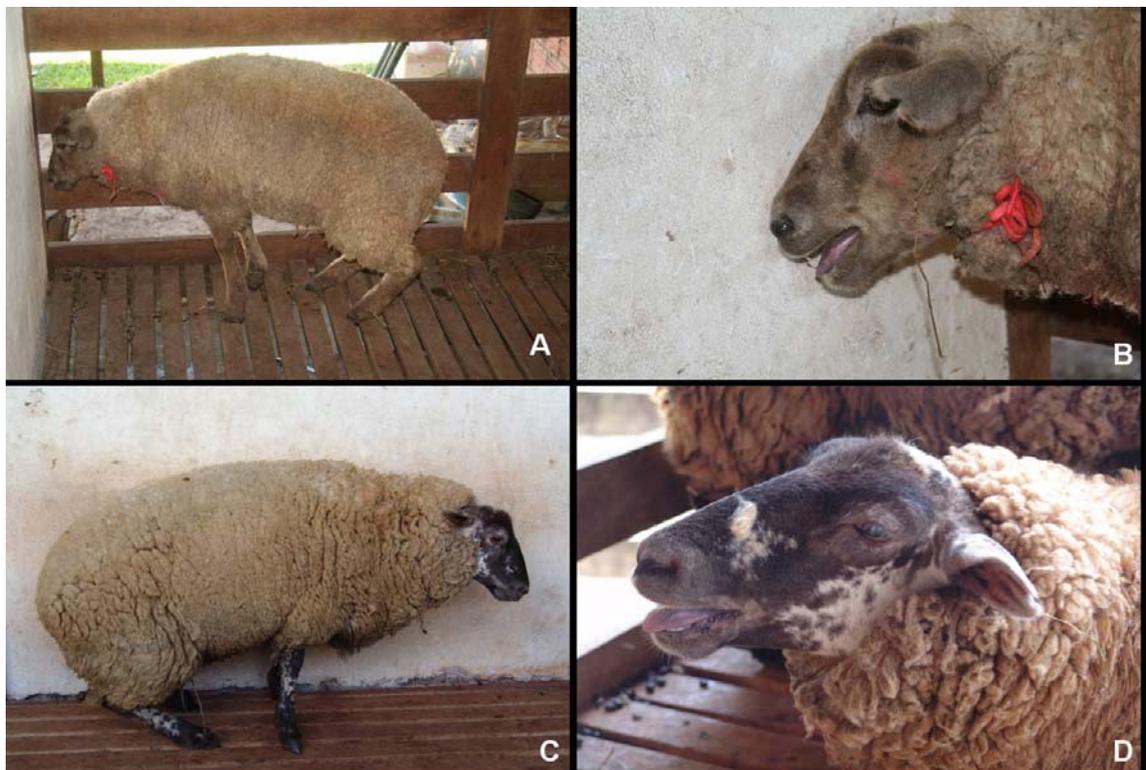


FIGURA 11 - Reprodução experimental da neurotoxicose causada por *Aspergillus clavatus* em ovinos com o bagaço de malte (A, B, ovino 2) e cultura do fungo (C, D, ovino 3). **A, C.** Animais demonstrando fraqueza nos membros pélvicos e deslocamento do apoio para os membros torácicos; **B, D.** Animais respirando com a boca aberta e exposição da língua.

Tabela 5 - Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos. Áreas e estruturas do sistema nervoso com lesões microscópicas e suas respectivas intensidades ^a

| Áreas ou estruturas do sistema nervoso com lesões | Ovino 1 | Ovino 2 | Ovino 3 | Ovino 4 | Ovino 5 | Ovino 6 | Ovino 7 |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <i>Intumescência lombar</i> | | | | | | | |
| Corno ventral | + | + | + | + | ++ | + | ++ |
| Corno dorsal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Intumescência cervical</i> | | | | | | | |
| Corno ventral | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + |
| Corno dorsal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Medula torácica</i> | | | | | | | |
| Corno ventral | + | + | + | 0 | + | + | + |
| Corno dorsal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bulbo ao nível do óbex</i> | | | | | | | |
| Núcleo motor dorsal do nervo | | | | | | | |
| vago | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | 0 |
| Núcleo ambíguo | 0 | + | ++ | 0 | + | + | 0 |
| <i>Cerebelo / Ponte</i> | | | | | | | |
| Núcleos vestibulares | + | 0 | + | + | ++ | + | ++ |
| Formação reticular da ponte | + | + | + | ++ | +++ | + | ++ |
| <i>Tálamo caudal ao corpo mamilar / colículos rostrais</i> | | | | | | | |
| Núcleo vermelho | ++ | +++ | +++ | + | +++ | ++ | + |
| Gânglio espinhal | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | - | - |
| Gânglio trigeminal | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ |
| Gânglio estrelado | - | - | ++ | - | ++ | + | 0 |
| Gânglio celíaco | - | ++ | + | + | + | + | 0 |
| Nervo isquiádico | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 |
| Nervo fibular | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Plexo braquial | - | - | 0 | 0 | 0 | - | 0 |
| Nervo vago | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^a Intensidade das lesões: (+) leve (1 a 5 neurônios cromatolíticos); (++) moderada (6 a 10 neurônios cromatolíticos); (+++) acentuada (mais que 10 neurônios cromatolíticos); (0) sem alterações; (-) não pesquisado; nos nervos as cruzes se referem à intensidade das lesões axonais.

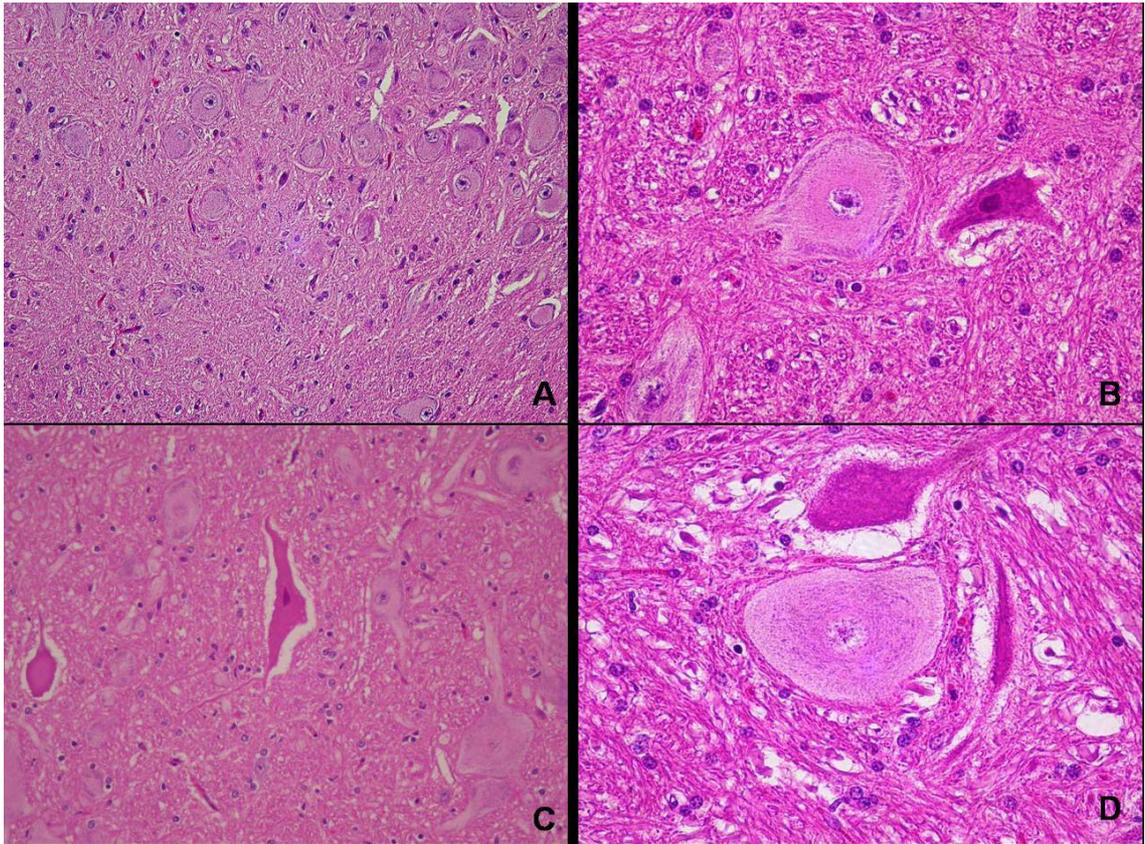


FIGURA 12 – Neurotoxicose causada pelo *Aspergillus clavatus* em ovinos. **A**, núcleo motor dorsal do nervo vago, grande número de neurônios com cromatólise central, alguns dos quais com deslocamento do núcleo para periferia do pericário. Hematoxilina e eosina (HE), Obj. 20. **B**, formação reticular da ponte, cromatólise central. HE, Obj. 40. **C**, Núcleo vermelho, neurônios retraídos com aumento da eosinofilia citoplasmática e picnose. HE, Obj. 20. **D**, núcleo vestibular medial, cromatólise periférica. HE, Obj. 40.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da neurotoxicose causada pelo *Aspergillus clavatus* neste caso foi baseado no conjunto de dados epidemiológicos, clínicos, patológicos e micológicos. O diagnóstico foi reforçado pela reprodução experimental do quadro clinicopatológico em ovinos com o bagaço de malte utilizado nas propriedades e com a cultura pura de *A. clavatus*. Os achados clínicos e patológicos dos surtos e da reprodução experimental aqui descritos são compatíveis com os relatados em casos prévios, espontâneos e experimentais, da neurotoxicose associada à ingestão de alimentos contaminados pelo *A. clavatus* (KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; 2002; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004;).

A morbidade dos surtos variou de 30 a 32,26% e a letalidade, de 50 a 100% semelhante ao descrito em outros surtos (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004). O início e a duração dos sinais clínicos nos ovinos deste estudo foram semelhantes aos descritos na literatura (KELLERMAN et al. 1976; 1984). Entretanto, o Ovino 4, que recebeu bagaço de malte da Propriedade 2, apresentou maior tempo para o início dos sinais clínicos e maior duração do quadro clínico. Estes dados sugerem que o subproduto desta propriedade era menos tóxico em relação ao da Propriedade 1. Por outro lado, a semelhança nos tempos de início dos sinais clínicos e evolução clínica sugerem que a toxidez do subproduto da Propriedade 1 foi comparável à da cultura pura do fungo. Essa aparente superior toxicidade do subproduto da Propriedade 1 talvez possa estar associada com a maior letalidade observada naquele surto.

Os sinais clínicos em ambos os surtos e dos ovinos da reprodução experimental eram predominantemente locomotores e semelhantes aos descritos por outros autores. Estes eram caracterizados principalmente por paresia e paralisia muscular progressiva, acompanhada por graus variáveis de tremores, hiperestesia e ataxia, com a percepção do ambiente, o apetite e a dipsia relativamente normais até próximo da morte ou eutanásia (KELLERMAN et al., 1976; 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al.,

1994; 2002; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; MCKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004).

Os tremores musculares, hiperestesia e ataxia exacerbados pela movimentação dos animais deste trabalho podem, ao menos em parte, estar relacionados à ação de micotoxinas tremorgênicas. No entanto, nos casos relacionados exclusivamente a estas os sinais clínicos não são acompanhados de lesões no sistema nervoso (NORRIS et al., 1980; GANT et al., 1987), como ocorre nos casos relacionados ao *A. clavatus*. A ação tremorgênica destas micotoxinas tem sido atribuída à inibição de receptores GABA_A (ácido gama-aminobutírico) (GANT et al., 1987) ou ao aumento na liberação de neurotransmissores em sinapses centrais e periféricas (NORRIS et al., 1980). As quantidades e os tipos neurotransmissores liberados variam entre as micotoxinas tremorgênicas. Verruculogen, por exemplo, aumenta a liberação de glutamato e aspartato, em 1300 e 1200%, respectivamente, mas não altera a liberação de GABA. Já penitrem A pode aumentar a liberação também de GABA (NORRIS et al., 1980). Embora essas não tenham sido pesquisadas nos surtos aqui apresentados, sabe-se que *A. clavatus* pode produzir algumas substâncias deste grupo, como: triptoquivalona, nortriptoquivalona, triptoquivalina e gliantripina (KELLERMAN et al., 1976; 1984; VARGA et al., 2003; SABATER-VILAR et al., 2004).

Alguns dos sinais clínicos observados podem também estar relacionados a déficits nas funções desempenhadas pelas populações de neurônios com lesões. Por outro lado, a ausência de sinais clínicos perceptíveis relacionados a déficits em alguns núcleos nervosos com lesões pode ter ocorrido devido à pequena porcentagem de neurônios afetados em cada núcleo. Há evidências em equinos com doença do neurônio motor que 30% ou mais dos neurônios devam estar com prejuízo das funções para que ocorram sinais clínicos perceptíveis (DIVERS et al., 1997).

A paresia e paralisia comumente observada nos animais podem estar relacionadas às lesões em neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal presentes, em graus variáveis, em todos animais deste estudo. Desta forma, representando uma paralisia de neurônios motores inferiores (DE LAHUNTA, 1983; BARROS et al., 2006). Em casos como os aqui descritos, onde há o envolvimento de vias proprioceptivas (gânglio espinhal) e motoras (neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal), a diferenciação de debilidade motora e ataxia pode ser difícil (DE LAHUNTA, 1983; BARROS et al., 2006), sendo muito provável que ambos estejam presentes. Sinais como ataxia, hipermetria e caminhar sobre os boletos dos membros

pélvicos observados em muitos dos animais do presente trabalho têm sido também associados a déficits proprioceptivos relacionados a lesões nos gânglios da raiz e suas projeções centrais. Isto é algumas vezes referido como ataxia sensorial para contrastar com a ataxia motora relacionada a doenças do córtex cerebelar (DE LAHUNTA, 1983). A ausência de lesões no córtex cerebelar dos animais do presente trabalho e de outros surtos descritos (KELLERMAN et al., 1976; 1984; LORETTI et al., 2003; McKENZIE et al., 2004) reforça esta hipótese. A redução da sensibilidade cutânea observada principalmente nas porções posteriores do corpo de alguns animais (Bovinos 2, 3 e 4), pode estar também relacionada a lesões nos gânglios espinhais e suas projeções centrais (DE LAHUNTA, 1983).

Alguns animais, particularmente os ovinos da reprodução experimental, apresentaram um caminhar com membros pélvicos rígidos. Estes sinais são semelhantes à hipertonia muscular observada em lesões de neurônio motor superior (DE LAHUNTA, 1983), em particular do núcleo vermelho (HOUK, 1991; CHIOCCHETTI et al., 2006). As lesões nos núcleos vermelhos presentes em todos os animais deste trabalho podem, desta forma, também ter contribuído para estes sinais.

Sinais clínicos como agressividade, hiperestesia, incoordenação e tremores observados em alguns animais do presente estudo têm sido induzidos pela destruição experimental de neurônios serotoninérgicos ao nível mesencefálico, em especial o núcleo vermelho (LEDOUX, 2005; CHIOCCHETTI et al., 2006). Desta forma as lesões no núcleo vermelho observadas nestes animais podem também ter contribuído, ao menos parcialmente, para estes sinais. Lesões do núcleo vermelho também têm sido associadas à parte das manifestações clínicas da encefalopatia espongiiforme bovina e da síndrome espástica bovinos (LEDOUX, 2005; CHIOCCHETTI et al., 2006).

A hipertermia observada no Ovino 3 é descrita apenas raramente na neurotoxicose causada pelo *A. clavatus* em bovinos (KELLERMAN et al. 1976) e pode estar relacionada a constante estimulação muscular pelos tremores, como ocorre em estados convulsivos (DE LAHUNTA, 1983).

A taquipnéia e respiração ofegante observadas em 6 dos 7 ovinos da reprodução experimental tem sido descrita em outros surtos relacionados ao *A. clavatus* (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004). No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação segura entre as áreas com lesões e a taquipnéia. Lesões na porção medial da ponte têm sido associadas taquipnéia em humanos (TARULLI et al., 2005). Como os ovinos não apresentavam

lesões significativas nos pulmões e apresentavam lesões nestas áreas (formação reticular da ponte), a origem neurogênica da taquipnéia não deve ser desconsiderada.

A degeneração e necrose neuronal cromatolítica, bilateral e relativamente simétrica, afetando seletivamente parte dos neurônios de determinados núcleos do tronco encefálico (tálamo, mesencéfalo, ponte, medula oblonga), dos cornos ventrais da medula espinhal e de gânglios espinhais observada nos casos presentes é semelhante à descrita em outros trabalhos (KELLERMAN et al., 1976; 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004). Alterações como neuronofagia, gliose e manguitos mononucleares observadas em um bovino de evolução longa têm sido descritas com pouca frequência por outros autores (KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005). A satelitose, a neuronofagia e os aglomerados celulares semelhantes aos nódulos de Nageotte (SUMMERS et al., 1995) observados nos gânglios espinhais de alguns bovinos também têm sido descritos em alguns surtos (VAN DER LUGT et al., 1994).

O envolvimento de neurônios dos gânglios trigêmeo, estrelado e celíaco observado em alguns animais do presente trabalho não tem sido relatado em outros surtos relacionados ao *A. clavatus* (EL-HAGE & LANCASTER, 2004). Entretanto, é interessante citar que o envolvimento concomitante de neurônios motores e de gânglios autônomos tem sido observado em algumas doenças como disautonomia eqüina ou “grass sickness” (HAHN et al., 2001) e em alguns casos de doença do neurônio motor de eqüinos (GERBER, 1994). Cabe ressaltar que, diferentemente dos casos de disautonomia, não foram observadas lesões nos plexos mioentéricos e submucosais nos cortes de intestino dos animais deste estudo.

No tronco cerebral dos casos aqui relatados tais lesões eram observadas frequentemente nos núcleos vermelhos, vestibulares (ovinos apenas), formação reticular da ponte, ambíguos e motores dorsais do nervo vago. Esta distribuição topográfica das lesões no tronco cerebral assemelha-se em grande parte a descrita em outros surtos (EL-HAGE & LANCASTER, 2004; GILMOUR et al., 1989; McKENZIE et al., 2004; VAN DER LUGT et al., 2002). Variações na intensidade e duração da doença talvez possam explicar pequenas diferenças nos neurônios afetados entre animais e surtos (HAHN et al., 2001).

Os neurônios envolvidos eram neurônios motores superiores (núcleo vermelho e formação reticular) e inferiores, sensoriais (gânglios espinhais e trigeminal) e de

gânglios autônomos. Desta forma parece mais apropriado classificar a enfermidade como uma doença neuronal degenerativa multisistêmica.

O padrão de distribuição de neurônios afetados no presente trabalho foi relativamente constante e reproduzível, indicando que os neurônios afetados compartilham características que os tornam sensíveis a agressões específicas (KELLERMAN et al. 1984). As principais características morfológicas que distinguem a maioria dos neurônios afetados de outros não afetados são seus axônios longos e de maior diâmetro, e o conseqüente grande volume celular (DE LAHUNTA et al., 1986; ZACHARY, 2007). Neste contexto, é interessante citar que, em relação aos neurônios motores superiores, os núcleos vermelho (DE LAHUNTA, 1986; CHIOCCHETTI et al., 2006), vestibulares laterais (GRANDIS et al., 2007) e da formação reticular (DE LAHUNTA, 1986) afetados nos animais deste estudo, são os principais a emitir projeções axonais ao nível da medula lombar em ruminantes. Ainda nesta linha, o córtex motor, geralmente afetado em algumas doenças que afetam neurônios motores de humanos (SUMMERS et al. 1995), era poupado nos casos aqui apresentados, o que é também observado por outros autores (KELLERMAN et al., 1976; LORETTI et al., 2003; McKENZIE et al., 2004). O trato cortico-espinhal, que constitui as projeções axonais de neurônios do córtex motor para medula espinhal, é bem desenvolvido nos primatas e pobremente desenvolvido nos bovinos e ovinos (DE LAHUNTA, 1986; CHIOCCHETTI et al., 2006). O pobre desenvolvimento destas projeções talvez possa explicar o não envolvimento desta área. Fato semelhante tem sido sugerido em relação à doença do neurônio motor de eqüinos (DIVERS et al., 1997). Outros grupos neuronais afetados, como os neurônios motores inferiores e dos gânglios espinhais, também emitem longas projeções axonais (DE LAHUNTA et al., 1986; ZACHARY, 2007), o que indica o comprimento do axônio seja uma característica importante na susceptibilidade dos neurônios na doença causada pelo *A. clavatus*.

Alguns fatores têm sido considerados críticos para estes neurônios, como por exemplo, interferências com o transporte axonal, desorganização de neurofilamentos, estresse oxidativo e excitatório (SUMMERS et al., 1995) e privação crônica de energia (CAVANAGH, 1988). A imuno-histoquímica não evidenciou acúmulo de neurofilamentos no pericário de neurônios afetados, como é observado em algumas doenças de neurônios motores (CUMMINGS et al., 1990; SUMMERS et al., 1995). Nos casos aqui apresentados, também não foram observadas alterações em astrócitos ou

vasos nas áreas com lesões neuronais, como descrito nas neuropatias tóxicas associadas à privação de energia (CAVANAGH, 1988; 1993).

Como ocorrido anteriormente (KELLERMAN et al., 1976), a participação da patulina na doença descrita aqui não pôde ser demonstrada, uma vez que a pesquisa da micotoxina no bagaço de malte da propriedade 1 e na cultura utilizada na reprodução experimental do Ovino 3 foi negativa. A participação desta e de outras micotoxinas na doença associada ao *A. clavatus* ainda necessita de comprovação (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; McKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004).

Nos casos aqui apresentados todos os animais apresentavam alterações significativas no pericário de determinados neurônios, mas apenas dois bovinos de evolução clínica longa apresentaram lesões em axônios no sistema nervoso periférico e/ou central. Esta ausência de lesões em axônios da medula espinhal (LORETTI et al., 2003; McKENZIE et al., 2004) ou de nervos periféricos (EL-HAGE & LANCASTER, 2004) tem sido descrita em alguns surtos. Além disso, diferente do que tem sido observado por alguns autores (VAN DER LUGT et al., 2002), não foram encontradas lesões significativas nas porções de axônios próximas ao pericário nem nas raízes ventrais da medula espinhal. Estas são apontadas por alguns autores como indicadores de agressão primária ao corpo celular ou neuropatias (VAN DER LUGT et al., 2002). As lesões observadas nos casos mais crônicos corroboram um processo de axonopatia levantada por outros autores (GILMOUR et al., 1989; SABATER-VILAR et al., 2004; VAN DER LUGT et al., 1994). Lesões com morfologia e distribuição semelhantes às descritas têm sido associadas ao processo patológico denominado axonopatia distal ou “dying back” (CAVANAGH, 1979; SUMMERS et al., 1995; FISCHER et al., 2004), embora as lesões axonais não sejam sempre necessariamente terminais (SUMMERS et al., 1995). Este mecanismo já foi proposto em surto associado ao *A. clavatus* (VAN DER LUGT et al., 1994). Sabe-se que, ao menos em algumas neuropatias tóxicas, o surgimento de alterações no pericário pode ocorrer já nas fases iniciais da doença quando os axônios estão praticamente intactos (STERMAN, 1983). Tal fato talvez possa explicar a ausência de lesões axonais na maioria dos animais do presente estudo. Alguns fatores têm sido apontados como importantes para presença, intensidade e distribuição (proximal ou distal) das lesões axonais em doenças afetando neurônios motores, como a intensidade da agressão ao corpo celular do neurônio (CUMMINGS et al., 1990) e o tempo de evolução da doença (VAN DER LUGT et al., 2002).

A distribuição da degeneração axonal na medula espinhal tem sido variável, podendo ocorrer em todos os tratos (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 2002), os funículos laterais e ventrais poupando funículos dorsais e adjacentes à substância cinzenta (VAN DER LUGT et al., 1994) ou principalmente áreas ao redor dos cornos ventrais (KELLERMAN et al., 1976). Nos casos aqui apresentados, havia lesões compatíveis com degeneração walleriana nos funículos dorsais da medula espinhal e áreas dorsais da medula oblonga do bovino de maior evolução clínica. Esta distribuição corresponde grandemente ao *Fasciculus gracilis* (YOSHIKAWA, 1968; JOHNSON et al., 2007). Desta forma é provável que estas lesões representem a degeneração das projeções axonais centrais de neurônios sensoriais bipolares localizados nos gânglios espinhais. Corroborando essa hipótese, nesse animal, como também nos demais dos surtos aqui apresentados, havia frequentemente degeneração e necrose cromatolítica em neurônios dos gânglios espinhais, algumas vezes acompanhada inclusive de neuronofagia. O processo patológico denominado axonopatia distal central-periférica apresenta lesões de morfologia e distribuição bastante semelhantes às descritas neste caso (SUMMERS et al., 1995). A ausência destas lesões axonais nos demais animais poderia estar relacionada ao curso clínico mais breve destes (STERMAN, 1983). Alternativamente, as lesões axonais centrais observadas poderiam ser reflexo de lesões primárias nas projeções periféricas dos neurônios dos gânglios espinhais. Estas têm sido associadas à degeneração retrógrada do corpo celular de neurônios sensoriais ganglionares, num processo denominado degeneração transgângliônica. (SUMMERS et al., 1995).

Os achados da lectina-histoquímica indicam o acúmulo de glicoconjugados contendo oligossacarídeos N-ligados ricos em manose em neurônios cromatolíticos em bovinos na doença causada pelo *A. clavatus* (SPICER & SCHULTE, 1992; BROOKS et al., 1996). O padrão de marcação observado no presente trabalho foi semelhante ao descrito por CHOU & WANG (1997) em uma doença de humanos também caracterizada por cromatólise neuronal envolvendo neurônios motores. Semelhante ao observado nos animais do presente estudo, entre as lectinas empregadas no referido artigo, as lectinas *Concanavalin ensiformis* (Con A) e *Triticum vulgaris* (WGA) apresentaram as marcações mais proeminente nos neurônios cromatolíticos. Não foram detectados também oligossacarídeos O-ligados em neurônios, uma vez que não havia marcações com as lectinas *Dolichos biflorus* (DBA), *Glycine max* (SBA), *Arachis hypogaea* (PNA). As lectinas *Glycine max* (SBA), RCA e WGA que apresentaram forte

marcação em vasos sanguíneos são marcadores conhecidos de glicoproteínas do endotélio cerebral normal (NAG, 1985).

O acúmulo neuronal de glicoproteínas nesta doença de humanos foi atribuído a internalização da matriz sináptica ou a falha no transporte destas substâncias para superfície celular (CHOU & WANG, 1997). No entanto, estudos ultra-estruturais não têm demonstrado alterações em sinapses de neurônios afetados na neurotoxicose causada pelo *A. clavatus* (VAN DER LUGT et al., 2002).

Outros possíveis mecanismos podem ser considerados. Uma falha no transporte de glicoproteínas axonais tem sido sugerida na neurotoxicose por acrilamida (HARRY, 1992). Uma significativa proporção dos carboidratos destas glicoproteínas consiste de oligossacarídeos ricos em manose (HART & WOOD, 1986), como os demonstrados nos bovinos do presente estudo. Um aumento na expressão de proteínas com glicosilação N-ligada também tem sido descrito em neurônios submetidos à axotomia ou à ação de algumas substâncias neurotóxicas (AOKI et al., 2002).

Vacúolos de diferentes tamanhos e bem definidos, por vezes ocupando boa parte do citoplasma dos neurônios, foram ocasionalmente observados em neurônios sem outras alterações evidentes nos gânglios espinhais e trigeminal de alguns bovinos, além do núcleo vermelho de um bovino. Vacúolos semelhantes a estes têm sido descritos, ao menos no núcleo vermelho (GAVIER-WIDEN et al., 2001) e no gânglio trigeminal (RECH et al., 2006), de animais sem manifestações de sinais neurológicos o que compromete a inclusão destes no quadro patológico associado ao *A. clavatus*. A vacuolização da substância branca observada em um bovino do presente surto, restrita a substância negra (nigra), é semelhante à relatada em animais sem sinais de doença neurológica (GAVIER-WIDEN et al., 2001) e dessa forma não pode ser relacionada ao quadro associado ao *A. clavatus*.

Como descrito em outros surtos havia nos bovinos degeneração e necrose de músculos esqueléticos selecionados dos membros (COLODEL et al., 2004; LORETTI et al., 2003; KELLERMAN et al., 1976; VAN DER LUGT et al., 2002), por vezes acompanhadas de mineralização (LORETTI et al. 2003). Mesmo bovinos com lesões não perceptíveis na macroscopia apresentavam lesões microscópicas menos intensas em alguns músculos. Estas lesões podem, entretanto, estar ausentes em alguns surtos (EL-HAGE & LANCASTER, 2004; GILMOUR et al., 1989; KELLERMAN et al., 1984; MCKENZIE et al., 2004; VAN DER LUGT et al., 1994). As lesões musculares em ovinos intoxicados experimentalmente quando presentes foram de intensidade menor,

semelhante ao descrito em outros trabalhos (KELLERMAN et al., 1976). A patogênese das lesões musculares ainda não foi esclarecida (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003) e mesmo sua inclusão como parte do quadro tóxico associado ao *A. clavatus* é contestada (EL-HAGE & LANCASTER, 2004). Entretanto tem sido sugerido que estas podem ser associadas à ação de metabólitos miotóxicos e neurotóxicos de *A. clavatus* (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003). Vários mecanismos atuando isoladamente ou em conjunto têm também sido propostos como: necrose isquêmica associada ao decúbito; síndrome do compartimento; traumatismos; ou contrações musculares vigorosas (LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004).

A recuperação clínica de alguns animais com sinais neurológicos pronunciados como ocorreu com bovinos da propriedade 2 e o Ovino 7 tem sido relatada em outros surtos após a eliminação do material contaminado (EL-HAGE & LANCASTER, 2004; GILMOUR et al., 1989; KELLERMAN et al., 1984; LORETTI et al., 2003). No exame histopatológico grande parte dos neurônios afetados apresentava claras indicações de alterações regressivas (exemplo: núcleos ausentes ou com picnose e cariorrexia). Entretanto, mesmo com a perda de neurônios, é possível que o restabelecimento de alguns neurônios afetados ainda viáveis possam ter restaurado as funções das áreas afetadas. Este restabelecimento tem sido observado em algumas neurotoxicoses ao menos em neurônios que projetam seus axônios para o sistema nervoso periférico (SUMMER et al. 1994). A exemplo do que foi observado no Ovino 7, que se recuperou da doença clínica, trabalhos anteriores descrevem lesões histológicas em ovinos que não demonstravam sinais clínicos perceptíveis (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003). Em eqüinos com doença do neurônio motor sinais clínicos só são observados quando 30% ou mais neurônios motores são comprometidos (DIVERS et al., 1997). Assim a extensão das lesões deva ser importante na apresentação clínica da doença. Por outro lado, alguns dos sinais clínicos poderiam estar relacionados, ao menos em parte, a micotoxinas tremorgênicas que são conhecidas por causarem alterações bioquímicas reversíveis (NORRIS et al., 1980). Assim a eliminação destas do organismo poderiam ter contribuído para a melhora clínica observada. Ainda, a destruição de neurônios no núcleo vermelho de algumas espécies tem sido associada a déficits funcionais reversíveis, provavelmente compensada por outras vias motoras ou treinamento pós-lesão (HOUK, 1991). No entanto, alguns animais sobreviventes podem permanecer com sinais locomotores (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989).

Na Propriedade 1 o Bovino 3 iniciou os sinais clínicos cerca de 10 dias após a retirada do subproduto contaminado da alimentação do rebanho. De forma semelhante, alguns trabalhos descrevem a ocorrência de casos novos após a remoção do material contaminado por um período de até 18 dias (GILMOUR et al. 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004).

O diagnóstico diferencial para a doença causada por *A. clavatus* deve incluir principalmente as síndromes tremorgênicas, o botulismo, a raiva, a leucose com envolvimento da medula espinhal e a intoxicação tardia por organofosforados. As lesões musculares, quando presentes, são de grande auxílio na diferenciação dessas enfermidades. Quando há lesões musculares, o diagnóstico diferencial deve incluir miopatias tóxicas e nutricionais, nestes casos, porém não há sinais neurológicos (LORETTI et al. 2003; BARROS et al. 2006; RIET-CORREA et al. 2007).

Apesar das semelhanças clínicas, em geral, nas intoxicações por *Claviceps paspali*, *Stenocarpella (Diplodia) maydis*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne* e *Ipomoea asarifolia* não são descritas lesões macro ou microscópicas. Nas intoxicações por plantas que causam doenças do armazenamento lisossomal em bovinos (*Sida carpinifolia*, *Solanum fastigiatum*, *Ipomoea carnea* subesp. *fistulosa* e *Turbina cordata*), a doença tremorgênica é acompanhada por vacuolização citoplasmática em diversos tecidos, incluindo neurônios, particularmente os do córtex cerebelar e cerebral, tálamo, mesencéfalo e medula espinhal. Embora presente na doença causada por *A. clavatus* a vacuolização neuronal não tem sido observada no córtex cerebelar ou cerebral. Na intoxicação por *Phalaris* spp., áreas verde azuladas no encéfalo (tálamo, mesencéfalo e medula oblonga) observadas na macroscopia correspondem a pigmento marrom-amarelado no citoplasma de neurônios semelhante a lipofuscina. As outras doenças mencionadas podem ser diferenciadas por lesões distintas (leucose e raiva) e ausência de lesões (botulismo) ou por dados epidemiológicos (intoxicação tardia por organofosforados) (LORETTI et al. 2003; BARROS et al. 2006; RIET-CORREA et al. 2007).

A encefalopatia espongiforme bovina (EEB) também é um importante diferencial devido às semelhanças clínicas e histológicas. Nestes casos a imunohistoquímica é crucial para uma diferenciação inequívoca (LORETTI et al. 2003; BARROS et al. 2006; RIET-CORREA et al. 2007). Nos casos aqui apresentados a imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti-proteína príon nos cortes da

medula oblonga ao nível do óbex de todos os animais foram consistentemente negativas.

Uma doença idiopática clinicamente semelhante à EEB caracterizada por cromatólise neuronal no tronco encefálico tem sido descrita em bovinos adultos no Reino Unido. A distribuição neuroanatômica dos neurônios cromatolíticos assemelha-se em parte a presente na neurotoxicose causada por *A. clavatus*, envolvendo principalmente neurônios dos núcleos vermelhos, vestibulares e motores dorsais do nervo vago. No entanto, além da cromatólise há infiltrado mononuclear perivascular e meningiano, vacuolização do neurópilo no córtex cerebral e, em alguns casos, perda de neurônios do hipocampo (JEFFREY & WILESMITH, 1996). Estas últimas lesões, não foram observadas nos casos aqui descritos.

Há ainda doenças do neurônio motor hereditárias de bezerros que podem mimetizar o quadro clínico e patológico da neurotoxicose causada por *A. clavatus* (SUMMERS et al., 1995). Entretanto, nestas são afetados apenas animais nas primeiras horas ou poucas semanas de vida. Além disso, há marcado acúmulo de neurofilamentos no pericário dos neurônios afetados, o que não foi observado nos casos aqui descritos.

Algumas circunstâncias envolvidas na ocorrência da enfermidade não puderam ser determinadas com exatidão. Uma vez que o fungo é considerado cosmopolita, presente em solo, fezes e materiais vegetais em decomposição (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; VARGA et al., 2003), a origem exata da contaminação do bagaço de malte utilizado nas propriedades é bastante complexa. A proliferação de diversos tipos de fungos ambientais pode ocorrer desde a germinação do grão de cevada, durante a produção do malte, até a utilização do subproduto nas propriedades rurais (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997; SIMAS et al., 2007). Apenas amostras das propriedades estavam disponíveis ao tempo dos surtos. Algumas condições importantes para crescimento e produção de micotoxinas por fungos, como condições atmosféricas (como temperatura ambiente) e do substrato (como nutrientes e umidade), muito provavelmente foram relativamente uniformes e propícias ao desenvolvimento do fungo nas propriedades da região nos mesmos períodos. As temperaturas médias observadas no período dos surtos estavam dentro das consideradas favoráveis ao fungo (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; MCKENZIE et al., 2004). Assim, a presença de cepas toxigênicas de *A. clavatus* e fatores de armazenagem e manuseio do alimento podem ter sido de importância para o surgimento do problema. Apesar do uso bastante difundido em rebanhos leiteiros na região (BARROS et al., 2006) nos períodos dos surtos os

criadores vizinhos que recebiam o mesmo material não registraram problemas. Considerando as condições ambientais e do subproduto homogêneas, pelo menos quatro possibilidades podem ser consideradas para explicar tal fato: 1) a contaminação pode ter ocorrido na propriedade por condições particulares de armazenamento, manuseio e tempo de estocagem; 2) considerando uma contaminação homogênea do material distribuído, as condições e tempo de armazenagem nas propriedades podem ter favorecido ao crescimento do fungo ou ainda os animais podem ter recebido quantidades diferentes, compondo dietas diferentes; 3) a contaminação do material distribuído pode não ter ocorrido de forma homogênea, assim apenas algumas frações estariam com problema; ou 4) a enfermidade pode ter sido não diagnosticada ou confundida com outras clinicamente semelhantes. Como em outros surtos (LORETTI et al., 2003) o subproduto continuou sendo utilizado mesmo com a presença de bolor. Além disso, as novas cargas de bagaço de malte recebidas foram colocadas nos mesmos locais sobre resíduos das antigas e já contaminadas.

As temperaturas ideais para o crescimento e produção de toxinas por *A. clavatus* não são incomuns na região, particularmente nos períodos de verão. A umidade do subproduto, cerca de 80% (SANTOS & RIBEIRO, 2005), também está dentro valores considerados propícios para o fungo (LOPEZ-DIAS & FLANNIGAN, 1997; MCKENZIE et al., 2004). Em um trabalho avaliando o subproduto de várias propriedades os menores níveis de contaminação fúngica foram observados na propriedade onde o subproduto era consumido num curto período de tempo e estocado de uma maneira que permitia sua drenagem (SIMAS et al., 2007). Assim, ao menos em relação à contaminação por *A. clavatus*, provavelmente o tempo de armazenagem do subproduto na forma úmida estará relacionado às condições ambientais e ao teor de umidade do subproduto. Neste sentido, a oferta do subproduto na forma dessecada tem sido preconizada como mais segura (BARROS et al., 2006).

6. CONCLUSÕES

- 1 Os surtos ocorridos nos dois rebanhos bovinos foram causados pela presença do fungo *Aspergillus clavatus* no bagaço de malte utilizado na alimentação dos animais.
- 2 As lesões microscópicas consistem de degeneração e necrose neuronal cromatolítica bilaterais e relativamente simétricas em núcleos nervosos específicos no tronco cerebral, cornos ventrais da medula espinhal e gânglios espinhais, trigeminal, estrelado e celíaco.
- 3 No tronco cerebral as lesões afetam neurônios dos núcleos vermelho, formação reticular da ponte, vestibular lateral, motor dorsal do nervo vago e ambíguo.
- 4 As lesões no sistema nervoso central dos bovinos apresentam padrão morfológico e distribuição regular, reproduzíveis nos ovinos pela administração do bagaço de malte contaminado e da cultura pura de *Aspergillus clavatus*.
- 5 A lectina-histoquímica indica acúmulo de glicoconjugados contendo oligossacarídeos N-ligados ricos em manose em neurônios cromatolíticos em bovinos na doença causada pelo *Aspergillus clavatus*.
- 6 Bovinos com evolução clínica mais longa podem apresentar degeneração walleriana nos funículos dorsais da medula espinhal, nervos isquiáticos e fibulares.
- 7 Todos os bovinos e três dos sete ovinos do estudo apresentam necrose muscular segmentar, multifocal.
- 8 As lesões musculares não são presentes em todos os músculos e nos ovinos, quando presentes, são em geral mais leves que nos bovinos, não associadas a processos regenerativos ou mineralização.
- 9 O envolvimento da patulina nos casos descritos no presente estudo não pôde ser comprovado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, S. et al. Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum–Golgi stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10751–10760, 2002.
- BARROS, C.S.L. et al. Intoxicação por *Aspergillus clavatus*. In:___**Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Montes Claros: Vallée, cap. 23, p. 117-120, 2006.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J.C.; SCHUMACHER U. **Lectin Histochemistry: a concise practical handbook**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1997. 117p.
- CAPITAINE, R. ; BALOUET, G. Étude histopathologique des lésions induites chez la souris par des injections intra-peritoneales et intracérébrales de patuline. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 54, n. 3, p. 361-368, 1974.
- CAVANAGH, J.B. The ‘dying back’ process. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 103, n. 13, p. 659-664, 1979.
- CAVANAGH, J.B. Lesion localization: implications for the study of functional effects and mechanisms of action. **Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 131-136, 1988.
- CAVANAGH, J.B. Selective vulnerability in acute energy deprivation syndromes. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 19, n. 6, p. 461-470, 1993.
- CHIOCCHETTI, R. et al. Cytoarchitecture, morphology, and lumbosacral spinal cord projections of the red nucleus in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 10, p. 1662-1669, 2006.
- CHOU, S.M.; WANG, H.S. Aberrant glycosylation / phosphorylation in chromatolytic motoneurons of Werdnig-Hoffmann disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 152, n. 2, p. 198-209, 1997.
- COLODEL, E.M. et al. Aspectos clínicos e patológicos da doença neurológica de bovinos reproduzida pela administração de milho contaminado com *Aspergillus clavatus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. supl., p. 16-17, 2004.
- DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 2nded. Philadelphia: Saunders, 1983. 471p.
- DIOGO, H.C.; SARPIERI, A.; PIRES, M.C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 6, p. 591-594, 2005.
- DIVERS, T.J.; MOHAMMED, H.O.; CUMMINGS, J.F. Equine motor neuron disease. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 13, n. 1, p. 97-105, 1997.
- EL-HAGE, C.M.; LANCASTER, M.J. Mycotoxic nervous disease in cattle fed sprouted barley contaminated with *Aspergillus clavatus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 10, p. 639-641, 2004.

- FISCHER, L.R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. **Experimental Neurology**, v. 185, n. 2, p. 232-240, 2004.
- GANT, D.B. et al. Action of tremorgenic mycotoxins on Gaba_A receptor. **Life Sciences**, v. 41, n. 19, p. 2207-2214, 1987.
- 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.
- GERBER, H. Equine motor neuron disease and grass sickness. **The Veterinary Record**, v. 135, n. 18, p. 440, 1994.
- GILMOUR, J.S. et al. A foeder mycotoxicosis of ruminants caused by contamination of distillery by-product with *Aspergillus clavatus*. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 6, p. 133-135, 1989.
- HAHN, C.N.; MAYHEW, L.G.; DE LAHUNTA A. Central neuropathology of equine grass sickness. **Acta Neuropathology**, v. 102, n.2, p. 153-159, 2001.
- HARRY, G.J. Acrylamide-induced alterations in axonal transport. **Molecular Neurobiology**, v. 6, n. 2-3, p. 203-216, 1992.
- HART, C.E.; WOOD, J.G. Analysis of the carbohydrate composition of axonally transported glycoconjugates in sciatic nerve. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 1365-1371, 1986.
- HOUK, J.C. Red nucleus: role in motor control. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 1, n. 4, p. 610-615, 1991.
- JEFFREY, M.; WILESMITH, J.W. Idiopathic brainstem neuronal chromatolysis of cattle: a disorder with clinical similarity to BSE. **The Veterinary Record**, v. 139, n.16, p. 398, 1996.
- JOHNSON, J.I. et al. **The sheep brain atlas**. Disponível em: <<http://www.msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>> Acesso em: 12 mar. 2007.
- KELLERMAN, T.S. et al. A highly fatal tremorgenic mycotoxicosis of cattle caused by *Aspergillus clavatus*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 3, p. 147-154, 1976.
- KELLERMAN, T.S. et al. A tremorgenic mycotoxicosis of cattle caused by maize sprouts infested with *Aspergillus clavatus*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 4, p. 271-274, 1984.
- KELLERMAN, T.S. et al. Central nervous system. In:___**Plant poisonings and mycotoxicosis of livestock in southern Africa**. 2.ed. p. 63-113, 2005.

LEDOUX, J. Effects on the serotonergic system in sub-acute transmissible spongiform encephalopathies: current data, hypotheses, suggestions, for experimentation. **Medical hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 910-918, 2005.

LOPEZ-DIAZ, T.; FLANNIGAN, B. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 129-136, 1997.

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, n. 2, p. 123-132, 2003.

MCKENZIE, R.A. et al. *Aspergillus clavatus* tremorgenic neurotoxicosis in cattle fed sprouted grains. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 10, p. 635-638, 2004.

NAG, S. Ultrastructural localization of monosaccharide residues on cerebral endothelium. **Laboratory Investigation**, v. 52, n. 5, p. 553-558, 1985.

NORRIS, P.J. et al. Actions of tremorgenic fungal toxins on neurotransmitter release. **Journal of Neurochemistry**, v. 34, n. 1, p. 33-42, 1980.

PROPHET, E.B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 254p.

RECH, R.R. et al. Histomorfologia do gânglio de Gasser, da *rete mirabile* carotídea e da hipófise de bovinos: estudo de 199 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 105-111, 2006.

SABATER-VILAR, M. et al. Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. **Mycopathologia**, v. 158, n. 4, p. 419-426, 2004.

SANTOS, M.S.; RIBEIRO, F.M. **Cervejas e refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. 58p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/producao_limpa/documentos/cervejas_refrigerantes.pdf> Acesso em: 12 mar. 2007.

SIMAS, M.M.S. et al. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 404-408, 2007.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995. 526p.

STERMAN, A.B. Altered sensory ganglia in acrylamide neuropathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 42, n. 2, p. 166-176. 1983.

TARULLI, A.W. et al. Central neurogenic hyperventilation – a case report and discussion of pathophysiology. **Archives in Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1632-1634, 2005.

VAN DER LUGT, J.J. et al. Spinal cord degeneration in adult dairy cows associated with the feeding of sorghum beer residues. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 65, n. 4, p. 184-188, 1994.

VAN DER LUGT, J.J.; PROZESKY, L.; VAN WILPE, E. Acute *Aspergillus clavatus* poisoning in cattle: light microscopical and ultrastructural lesions in the spinal cord. In: VAN DER LUGT, J.J. **The Clinicopathology and Pathology of Selective Toxicoses and Storage Diseases of the Nervous System of Ruminants in Southern Africa**. Utrecht: University of Utrecht, 2002. cap. 4.2, p.131-141.

VARGA, J. et al. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, n. 2, p. 191-200, 2003.

VAZ, A.C.S.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Avaliação da composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte visando sua utilização em processos fermentativos. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2005, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: UNICAMP, 2005. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/rBT39.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2007.

VILLALOBOS, E.M.C. et al. Micotoxicose em vacas lactantes causada pelo fungo *Aspergillus clavatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 62, n. 1/2, p. 7-14, 1995.

YOSHIKAWA, T. **Atlas of the brains of domestic animals**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1968.

ZACHARY, J.F. Nervous System. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4thed. Missouri: Mosby, cap. 14, p. 833-972, 2007.

WANG, J. et al. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 51-57, 2002.

APÊNDICE A

Neste item está incluída cópia do aceite e resumo do primeiro artigo que será publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Data: Thu, 23 Oct 2008 17:59:41 -0300
De: Jürgen Döbereiner <jurgen@ufrj.br>
Para: "Pedro Soares Bezerra Junior" <bezerraj@ufla.br>
Assunto: Trabalho 1339 LD

Prezado Dr. Pedro Soares Bezerra Jr,

Comunicamos que o Trabalho 1339 LD, intitulado de "Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*", de autoria sua e de Djeison Lutier Raymundo, Andréia Spanemberg, André Mendes Ribeiro Corrêa, Jorge J. Bangel Júnior, Laerte Ferreiro e David Driemeier, submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, foi aceito para publicação.

Atenciosamente,

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq.Vet.Bras.

Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*¹

Pedro Soares Bezerra Jr^{2*}, Djeison Lutier Raymundo³, Andréia Spanemberg⁴, André Mendes Ribeiro Corrêa³, Jorge J. Bangel Júnior⁵, Laerte Ferreira⁴ e David Driemeier³

ABSTRACT: Bezerra Jr P.S., Raymundo D.L., Spanemberg A., Corrêa A.M.R., Bangel Jr J.J., Ferreira L. & Driemeier D. 2008. [**Neurotoxicosis in cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*.**] Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: bezerraj@ufla.br

Two outbreaks of a neurological disease affecting herds of dairy cattle that were fed moldy beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus* in the county of Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil, are described. The morbidity of both outbreaks was of 30% and the lethality was of 50% and 100%. The clinical evolution varied from 5 to 64 days. Only one of the animals that recovered from the disease remained with slight locomotor sequels. The clinical signs were predominantly locomotor and included muscle tremors of varied intensity, hyperesthesia and progressive posterior ataxia, paresis and paralysis with knuckling of fetlocks of the hind limbs. Gait abnormalities were more pronounced after exercises that in general led to falling down. There was also reduced milk production, but appetite and water intake were maintained until close to death or euthanasia. Five cattle were necropsied and two presented macroscopic lesions characterized by necrotic changes and mineralization mainly in pelvic muscle and thoracic limbs. The main histological findings consisted of chromatolytic neuronal degeneration and necrosis in selected nuclei of the brain stem, the ventral horn of the spinal cord and spinal, trigeminal, stellate and celiac ganglions. In two cattle there was Wallerian degeneration in dorsal funiculi of the spinal cord and ischiadic and fibular nerves. The diagnosis was based on epidemiological data, clinical signs, necropsy findings, histological lesions and mycological examination. Epidemiologic, clinical and pathologic aspects, pathogenetic mechanisms and differential diagnoses are discussed.

INDEX TERMS: *Aspergillus clavatus*, cattle, beer residues, neurotoxicosis, chromatolysis neuronal.

RESUMO.- Descrevem-se dois surtos de uma doença neurológica que afetou rebanhos bovinos leiteiros que consumiam bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus* no município de Viamão, estado do Rio Grande do Sul. A morbidade em ambos os surtos foi em torno de 30% e a letalidade, 50% e 100%. A evolução clínica da doença variou de 5 a 64 dias. Dentre os animais que se recuperaram apenas um permaneceu

¹Recebido em 23 de julho de 2008.

Aceito para publicação em 23 de outubro de 2008.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, no Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG 37200-000, Brasil. *Autor para correspondência: bezerraj@ufla.br

³ Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

⁴ Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

⁵ Departamento de Medicina Animal, UFRGS, Porto Alegre, RS.

com seqüelas locomotoras leves. Os sinais clínicos eram predominantemente locomotores e incluíam tremores musculares de intensidade variável, hiperestesia e membros pélvicos com ataxia, paresia e paralisia progressivas e apoio sobre os boletos. Os distúrbios locomotores eram intensificados pelo exercício que, em geral, desencadeava quedas. Havia também marcada queda na produção leiteira, no entanto o apetite e a dipsia eram mantidos até próximo da morte ou eutanásia. Cinco bovinos foram necropsiados e destes dois apresentaram lesões macroscópicas nos músculos esqueléticos principalmente nos membros pélvicos e torácicos caracterizadas por alterações necróticas e mineralização. No sistema nervoso, os principais achados consistiam de degeneração e necrose neuronal cromatolítica em núcleos nervosos específicos no tronco encefálico, nos cornos ventrais da medula espinhal e nos gânglios trigeminal, estrelado, celíaco e espinhais. Em dois bovinos havia adicionalmente degeneração Walleriana nos funículos dorsais da medula espinhal e nervos isquiático e fibular. O diagnóstico foi baseado nos dados epidemiológicos, sinais clínicos, achados de necropsia, histopatológicos e micológicos. Os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da enfermidade, além de possíveis mecanismos patogénicos e diagnósticos diferenciais são discutidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Aspergillus clavatus*, bovinos, bagaço de malte, neurotoxicose, cromatólise neuronal.

APÊNDICE B

Neste item está incluída cópia do aceite e do resumo do segundo artigo que será publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Data: Thu, 23 Oct 2008 18:06:00 -0300

De: Jürgen Döbereiner <jurgen@ufrj.br>

Para: "Pedro Soares Bezerra Junior" <bezerraj@ufla.br>

Cópia: "David Driemeier" <davetpat@ufrgs.br>

Assunto: Trabalho 1386 LD

Prezado Dr. Pedro S. Bezerra Júnior,

Comunicamos que o Trabalho 1386 LD, intitulado de "Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos", de autoria sua e de Adriana da Silva Santos, Paulo Mota Bandarra, Pedro M. Ocampos Pedroso, Saulo Petinatti Pavarini, Andréia Spanamberg, Laerte Ferreiro e David Driemeier, submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, foi aceito para publicação.

Atenciosamente,

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.

Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos¹

Pedro Soares Bezerra Júnior², Adriana da Silva Santos³, Paulo Mota Bandarra³; Pedro Miguel Ocampos Pedrosa³, Saulo Petinatti Pavarini³, Andréia Spanemberg⁴, Laerte Ferreiro⁴ e David Driemeier^{3*}

ABSTRACT.- Bezerra Jr P.S., Santos A., Bandarra P.M., Pedrosa P.M., Pavarini, S.P., Spanemberg A., Ferreiro L. & Driemeier D. 2009. [**Experimental poisoning by *Aspergillus clavatus* in sheep.**] Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(00):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

This paper describes the experimental reproduction of a neurological condition in sheep by the administration of a beer by-product contaminated with *Aspergillus clavatus* and pure culture of the fungus. This beer by-product was originated from two farms where outbreaks of *A. clavatus* poisoning in cattle had occurred. The onset of clinical signs was 2 to 6 days after dosage of the contaminated beer by-product or pure *A. clavatus* culture, and the clinical course lasted from one and a half to 12 days. Clinical signs were predominantly of locomotor and respiratory nature and included muscle tremors, hyperesthesia, and progressive tachypnea, rigidity of the pelvic limbs, posterior weakness, and recumbency. One sheep also showed occasional knuckling of fetlocks of the hind limbs. Gait abnormalities and tremors were more pronounced after exercise. In 6 of 7 sheep, the appetite and dyspsia were maintained until close to death or euthanasia. The main histological findings consisted of chromatolytic neuronal degeneration and necrosis in selected nuclei of the brain stem, the ventral horn of the spinal cord and the spinal, trigeminal, stellate and celiac ganglions. Three sheep also presented degenerative and necrotic mild changes in muscles of the pelvic and thoracic limbs.

INDEX TERMS: *Aspergillus clavatus*, sheep, beer by-product, poisoning, neuronal chromatolysis.

RESUMO.- Descreve-se a reprodução experimental de doença neurológica em ovinos através da administração de bagaço de malte (resíduo cervejaria) contaminado com *Aspergillus clavatus* e da cultura pura do fungo. Esse resíduo de cervejaria estava sendo utilizado em duas propriedades, onde ocorreram surtos da doença em bovinos. Os sinais clínicos iniciaram cerca de 2 a 6 dias após a administração do subproduto ou da cultura e a evolução clínica foi de 1,5 a 12 dias. Os sinais clínicos, que foram predominantemente locomotores e respiratórios, incluíram tremores musculares, hiperestesia, taquipnéia progressiva, rigidez de membros pélvicos (mais evidente à locomoção), fraqueza dos posteriores e decúbito. Um ovino também apresentou apoio ocasional sobre os boletos dos membros pélvicos. As anormalidades locomotoras e tremores eram intensificados pelo exercício. Entretanto, em 6 dos 7 ovinos, o apetite e a

¹Recebido em 23 de setembro de 2008.

Aceito para publicação em 23 de outubro de 2008.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor no Curso de Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG 37.200-000, Brasil.

³Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

⁴Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

dipsia eram mantidas até próximo à morte ou eutanásia. O principal achado histológico consistia de degeneração e necrose neuronal cromatolítica em núcleos nervosos específicos do tronco encefálico, cornos ventrais da medula espinhal e gânglios espinhais , trigeminal, estrelado e celíaco. Três ovinos também apresentaram degeneração e necrose leves em músculos dos membros pélvicos e torácicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Aspergillus clavatus*, ovinos, bagaço de malte, intoxicação, cromatólise neuronal.