

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida
carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos.

ANDERSON LUÍS SEITZ

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias, na área de
concentração em Patologia Veterinária,
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul – RS.

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Porto Alegre, 17 de Junho de 2003.

Dissertação de Mestrado

Executor: Anderson Luís Seitz

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Projeto: Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos.

Período: Março de 2001 até Março de 2003.

Hierarquia da Pesquisa:

Grande Área: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-área: Cirurgia e Patologia Animal

Especialidade: Patologia Animal

Linha de Pesquisa: Anestesiologia, Farmacologia, Toxicologia e Terapêutica
Animal.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa **Katia** pelo apoio, compreensão e ajuda nas traduções.

Aos meus pais, Bruno e Marilene, pelos ensinamentos éticos, morais e espirituais.

Ao orientador e amigo David, pelo exemplo de ética, dedicação e persistência.

Ao amigo Edson, pela disposição em ajudar sempre.

À amiga Sandra, pelo companheirismo e exemplo de força.

Aos funcionários e amigos Marília, Ângela e Roger.

Aos amigos, bolsistas e estagiários do Setor de Patologia: Luciana, Milene, Caetano, André, Fernanda, Priscila, Pedro, Marcelo e Fabiano.

À Dr^a Olinda Leites Bueno, da Fundação Zoobotânica, pela classificação da planta.

Ao prof. Dr. Eduardo Juan Gimeno da Universidad Nacional de La Plata , Argentina, pelo auxílio nos exames de histoquímica das lectinas.

Ao prof. Severo Sales de Barros, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio em microscopia eletrônica de transmissão.

“Procura conhecer o estado das tuas ovelhas; cuida bem dos teus rebanhos.”

(Provérbios 27:23)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Doenças do armazenamento lisossomal de interesse veterinário	15
2.1.1. Fisiopatogenia das doenças do armazenamento lisossomal	16
2.1.2. Doenças do armazenamento lisossomal adquiridas	18
2.1.3. Doenças do armazenamento lisossomal hereditárias	18
2.1.4. A α -manosidose	19
2.2. <i>Sida carpinifolia</i>	24
2.2.1. Aspectos botânicos e biológicos	24
2.2.2. Dados epidemiológicos	27
2.2.3. Sinais clínicos	28
2.2.4. Achados de necropsia	28
2.2.5. Achados histopatológicos	28
2.2.6. Histoquímica das lectinas	29
2.2.7. Microscopia eletrônica de transmissão	29
2.2.8. Diagnóstico	29
2.2.9. Diagnóstico diferencial	30

2.2.10. Tratamento e profilaxia	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Procedimentos gerais	31
3.2. Eutanásia	34
3.3. Material coletado na necropsia	34
3.4. Cortes do sistema nervoso central	34
3.5. Histologia	39
3.6. Histoquímica das lectinas	39
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Consumo de <i>Sida carpinifolia</i> secada à sombra e triturada	41
4.2. Sinais clínicos	41
4.3. Achados de necropsia	43
4.4. Achados histológicos e ultra-estruturais	43
4.5. Histoquímica das lectinas	49
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos envolvidos nas doenças do armazenamento lisossomal.	17
Tabela 2. Doenças do armazenamento lisossomal de interesse veterinário, que afetam o sistema nervoso central _____	18
Tabela 3. Características gerais dos ovinos do experimento e período de consumo de <i>Sida carpinifolia</i> . _____	33
Tabela 4. Análise bromatológica da <i>Sida carpinifolia</i> . _____	34
Tabela 5. Lectinas utilizadas para diagnóstico de intoxicação por <i>Sida carpinifolia</i> . _____	39
Tabela 6. Aspectos gerais do experimento. _____	41
Tabela 7. Intensidade de coloração das lectinas em ovinos controles e intoxicados por <i>Sida carpinifolia</i> . _____	50
Tabela 8. Análise da matéria seca, de <i>Sida carpinifolia</i> secada à sombra e moída. _____	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fórmula química do alcalóide 1,2,8-triol indolizidina (swainsonina). 26
- Figura 2. *Sida carpinifolia* em floração, mês de janeiro de 2001, Porto Alegre, RS.
_____ 31
- Figura 3. Local de coleta da *Sida carpinifolia* (março de 2001 - Viamão, RS).__ 32
- Figura 4. Cérebro ovino, visão lateral, seções selecionadas para exame
histológico. _____ 36
- Figura 5. Seção 1 - Córtex frontal sobre o corpo estriado e quiasma óptico. ____ 36
- Figura 6. Seção 2 - Córtex frontal sobre o tálamo e corpo mamilar. _____ 37
- Figura 7. Seção 3 - Córtex occipital sobre o colículo rostral do mesencéfalo. __ 37
- Figura 8. Seção 4 - Cerebelo na altura do pedúnculo cerebelar caudal. _____ 38
- Figura 9. Seção 5 - Medula oblonga sobre óbex. _____ 38
- Figura 10. Cerebelo, ovino 4: vacuolização das células de Purkinje (Obj. 10, HE).
_____ 44
- Figura 11. Ovino 4, cerebelo: camada de Purkinje, acentuada vacuolização das
células de Purkinje, com citoplasma granular (seta). Esferóide axonal (cabeça
de seta) (Obj. 40, HE). _____ 45
- Figura 12. Ovino 1, medula espinhal cervical: vacuolização de neurônio do corno
ventral. (Obj. 100, HE). _____ 45
- Figura 13. Ovino 5, seção 1, córtex cerebral: vacuolização neuronal (Obj. 40,
HE). _____ 46
- Figura 14. Ovino 4, tireóide: vacuolização das células foliculares, colóide com
aspecto normal (Obj. 40, HE). _____ 47

- Figura 15. Ovino 7, rim: acentuada vacuolização das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (Obj. 40, HE). _____ 47
- Figura 16. Ovino 7, testículo: degeneração das células germinativas do epitélio testicular com ausência de espermatozóides (Obj. 10, HE). _____ 48
- Figura 17. Ovino 7, tireóide: presença de vacuolização das células foliculares (V) apresentando colóide com aspecto normal (C) (ME, 10.500 x). _____ 49
- Figura 18. Ovino 5, cerebelo: histoquímica das lectinas, forte marcação das células de Purkinje com SWGA (Obj. 10). _____ 51
- Figura 19. Ovino 5, cerebelo: histoquímica das lectinas, forte marcação de neurônios dos núcleos cerebelares com SWGA (Obj. 40). _____ 51

RESUMO

Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos.

Autor: Anderson Luís Seitz

Orientador: David Driemeier

A *Sida carpinifolia* tem como substância ativa tóxica o alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol, também chamado de swainsonina. Este alcalóide age inibindo por competição a enzima α -manosidase do lisossomo e a enzima α -manosidase II do aparelho de Golgi. Essa inibição resulta em uma degradação deficiente dos oligossacarídeos, causando seu acúmulo no interior da célula que leva a vacuolização e morte.

Para este estudo foram utilizados sete ovinos que receberam *Sida carpinifolia* secada à sombra e moída. Um animal morreu sem apresentar sinais clínicos, aos 18 dias do início do experimento, e foi necropsiado. Outros cinco animais foram eutanasiados e necropsiados aos 30, 45, 53, 75 e 100 dias. A fim de se verificarem as regressões dos sinais clínicos e lesões microscópicas, um ovino teve a *Sida carpinifolia* retirada da sua dieta ao 80º dia do experimento e foi eutanasiado e necropsiado aos 150 dias após o início do experimento. A quantidade mínima consumida voluntariamente da planta seca foi de 11,19 g/kg/dia e a quantidade máxima foi de 30,31 g/kg/dia.

O quadro clínico e evolução da doença foi semelhante em todos os casos, observando-se diarréia em torno dos 20 dias do experimento. A partir dos 25 dias os ovinos apresentaram sinais clínicos neurológicos caracterizados por ataxia com hipermetria e dismetria, tremores da cabeça, reações posturais atípicas, quedas freqüentes, lentidão dos movimentos, dificuldade em apreender e deglutir os alimentos. Esses sinais clínicos se acentuavam quando os animais eram manuseados. Em quatro animais foi observada emaciação progressiva.

Na necropsia foi observado apenas aumento de volume dos linfonodos mesentéricos. Na microscopia foram observadas alterações mais significativas no sistema nervoso central, caracterizando-se por distensão e vacuolização citoplasmática múltipla e acentuada, afetando principalmente as células de Purkinje do cerebelo, os neurônios do córtex cerebral, do tálamo, do mesencéfalo e dos cornos ventrais da medula espinhal. Também foram observados esferóides axonais no encéfalo e mais freqüentes na camada granular do cerebelo. A vacuolização citoplasmática característica foi observada também no epitélio dos ácinos pancreáticos e dos túbulos renais e, ainda, nas células foliculares da tireóide, nos hepatócitos e macrófagos de órgãos linfóides.

As lesões ultra-estruturais observadas foram vacuolizações citoplasmáticas algumas envoltas por membranas em neurônios de Purkinje do cerebelo e nas células foliculares da tireóide. O ovino que permaneceu 70 dias sem consumir *Sida carpinifolia* não apresentou alterações significativas. Na microscopia eletrônica apresentava apenas dilatação do retículo endoplasmático rugoso das células de Purkinje do cerebelo.

Na histoquímica das lectinas, os vacúolos nas células de Purkinje do cerebelo reagiram fortemente com a *Concanavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* e *Triticum vulgare succinilado*. O padrão obtido neste estudo é similar ao

encontrado em ovinos naturalmente intoxicados por *Sida carpinifolia*.

ABSTRACT

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Author: Anderson Luís Seitz

Adviser: David Driemeier

Title: Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* (Malvaceae) in sheep.

Master Dissertation in Veterinary Medicine, major in veterinary pathology, Porto Alegre, RS.

LYSOSOMAL STORAGE DISEASE CAUSED BY Sida carpinifolia (Malvaceae) IN SHEEP.

The indolizidine alkaloid 1,2,8-triol swainsonine has been identified as the toxic constituent of Sida carpinifolia. This alkaloid acts by competitive inhibition of lysosomal α -manosidase and Golgi-manosidase II. This inhibition causes a deficient degradation of oligosaccharide resulting in cell accumulation, which leads to vacuolation and cell death.

Seven sheep received dry crushed Sida carpinifolia. One of them died at 18 days of experiment without presenting any clinical signs. Five others were euthanatized and necropsied at 30, 45, 53, 75 and 100 days. In order to study the regression of clinical signs and microscopic lesions, Sida carpinifolia was withdrawn at 80 days of experiment from one sheep's diet, that was euthanized and necropsied 70 days later. The minimal amount of dry plan consumed was 11.19 g/kg and the maximum was 30.31 g/kg.

The progression of clinical findings was similar in all cases with diarrhea at 20 days of experiment. Neurological signs were observed at 25 days (ataxia with hipermetria and dismetria, muscle tremors in the head, atypical postural reactions, frequent falls, sluggish of movements, difficulty in grazing and swallowing). These findings were increased when the animals were under stress. Four of the animals presented progressive emaciation.

On necropsy, only enlarged mesenteric lymph nodes were observed. The histological alterations were more significant on central nervous system, with multiple and severe cytoplasmic distention and vacuolation which affects specially Purkinje cells of the cerebellum, neurons of cerebral cortex, thalamus, midbrain and ventral horn of spinal cord. Axonal spheroids on the brain, more frequently on the granular layer of cerebellum were also observed. The cytoplasmic vacuolation was also found on pancreatic acinar cells, renal tubules, thyroid follicular epithelium, hepatocytes and macrophages of lymphoid organs.

The ultrastructural lesions observed were cytoplasmic vacuolation, some surrounded by membranes in Purkinje cells of cerebellum and thyroid follicular cells. The sheep which had Sida carpinifolia withdrawn from its diet for 70 days had no significant changes. On electronic microscopy it presented only dilation of rough endoplasmic reticulum of Purkinje cell.

*On lectin histochemistry the vacuoles of Purkinje cells had a strong reaction with *Concanavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* and succinyl *Triticum vulgare*. The pattern found in this study is similar to the one found in naturally poisoned sheep.*

1. INTRODUÇÃO

A *Sida carpinifolia* é uma planta sub-arbustiva que prefere os lugares sombreados, ao redor de bosques, se propaga por sementes e freqüentemente invade as pastagens em propriedades do sul do Brasil (LORENZI, 2000b). Esta planta é empregada na medicina caseira no Brasil e no Mundo. Sua eficácia e segurança ainda não foram comprovadas cientificamente. Pela tradição popular, é usada como antipirética, anti-hemorroidal, emoliente, diurética e antiinflamatória (KHOLKUTE et al., 1978), embora alguns pesquisadores não comprovem sua eficácia antiinflamatória (GUTERRES et al., 1987; HENRIQUES et al., 1989). Suas folhas, valorizadas pelo sabor e mucilagem, são utilizadas através de infusão para tratamento de diarreia (LORENZI, 2002).

O princípio ativo tóxico presente nessa planta é o alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol (COLODEL et al., 2002b), que inibe a enzima α -manosidase lisossomal, impedindo a hidrólise dos oligossacarídeos e causando, portanto, seu acúmulo no interior das células. Outra enzima que esse alcalóide inibe é a α -manosidase II do complexo de Golgi. Essa enzima, por sua vez, é responsável pela glicosilação das proteínas e sua deficiência causa o acúmulo de oligossacarídeos contendo manose nos lisossomos. Esses resíduos, que ficam retidos dentro das células, não são comprovadamente tóxicos. As lesões celulares e suas conseqüências decorrem dos efeitos mecânicos do armazenamento das moléculas grandes de oligossacarídeos e da dificuldade em realizar as atividades metabólicas citoplasmáticas de transporte (AGAMANOLIS, 1995; MOREMEN, 2002).

Os carboidratos são amidos ou açúcares que são distribuídos nos tecidos animais e vegetais. Nos animais, constituem uma importante fonte de energia para as atividades vitais. Alguns possuem funções altamente específicas (ex., a ribose, na nucleoproteína das células; a galactose, em certas gorduras; e a lactose, no leite). Quimicamente, os carboidratos são definidos como derivados aldeídicos ou cetônicos de álcoois poliidrícos (que possuem mais de um grupo OH) superiores. São divididos em quatro grupos: monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são açúcares simples que não podem ser mais hidrolisados em compostos mais simples. Os oligossacarídeos são aqueles que, por hidrólise, fornecem de duas a seis unidades de monossacarídeos (HARPER et al., 1982).

Já foram descritos surtos naturais de intoxicação por *Sida carpinifolia* em caprinos, que apresentaram problemas reprodutivos e sinais neurológicos (COLODEL et al., 2002a; DRIEMEIER et al., 1998; DRIEMEIER et al., 2000) e também em pôneis, que apresentaram abdômen agudo, sinais neurológicos e morte após ingerirem a planta por 21 dias (LORETTI et al., 1999; LORETTI et al., 2003). A intoxicação espontânea também foi observada em ovinos, que apresentavam sinais clínicos neurológicos (SEITZ et al., 2002).

Os objetivos deste trabalho com ovinos são: determinar a toxicidade da *Sida carpinifolia*, caracterizar o quadro clínico evolutivo da doença com reprodução experimental, descrever achados macroscópicos, histológicos e ultra-estruturais presentes na sua intoxicação. Esses dados objetivam facilitar o diagnóstico da intoxicação natural e contribuir para o estudo da evolução e profilaxia desta enfermidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doenças do armazenamento lisossomal de interesse veterinário

Os lisossomos são vesículas intracitoplasmáticas, delimitadas por membranas, que contêm mais de quarenta enzimas hidrolíticas (ou hidrolases ácidas), com a função de digestão. São os principais centros de eliminação e reciclagem das células (KING & ALROY, 2000). Essas organelas estão presentes em todas as células e são mais abundantes naquelas que possuem a capacidade de fagocitar. Os tipos de enzimas lisossomais variam conforme as células porém todas possuem atividade máxima em pH 5,0. As mais comuns são: fosfatase ácida, protease, sulfatase, lipase e β -glicuronidase. Essa lista demonstra que as enzimas presentes nos lisossomos são capazes de digerir todo tipo de molécula orgânica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

A degradação das quatro classes de macromoléculas biológicas (aminoácidos, ácidos graxos, ácidos nucleicos e açúcares) é mediada por grandes quantidades de hidrolases ácidas. Essas enzimas, juntamente com as proteínas secretórias e de membrana plasmática, são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático rugoso e translocadas até o aparelho de Golgi. No aparelho de Golgi, todas as hidrolases, exceto a glicocerebrosidase e a fosfatase ácida, são segregadas do restante das proteínas recém-sintetizadas pela adição de um resíduo de manose-6-fosfato terminal. Esse resíduo serve como marcador de identificação para receptores específicos localizados na membrana plasmática e também nas membranas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi (KING & ALROY, 2000).

Depois que a enzima se liga ao receptor de membrana no aparelho de Golgi, o complexo enzima-receptor deixa essa organela na forma de vesículas revestidas, sendo transportado para o exterior da célula, onde é recapturado por pinocitose, depois de ter-se ligado à membrana plasmática, ou é conduzido até vesículas limitadas por membrana, que se transformam em lisossomos primários. No lisossomo primário, a hidrolase é liberada do seu marcador (manose-6-fosfato) pela acidificação do compartimento e, assim, a enzima se torna reativa. O marcador retorna ao aparelho de Golgi carreando outra enzima para o lisossomo primário (KING & ALROY, 2000).

Constituintes extracelulares e intracelulares são transportados por fagocitose, endocitose, e autofagia para serem catabolizados nos lisossomos. Assim que essas moléculas são catabolizadas, seus produtos são transferidos para o citosol e, se necessário, reutilizados para síntese. Este catabolismo que ocorre nos lisossomos pode ser considerado como uma seqüência linear de reações, em que o produto de uma reação serve como substrato para a reação seguinte. Normalmente, quase todas as hidrolases lisossômicas estão presentes em níveis de atividade suficientemente elevados e o acúmulo do substrato ocorre apenas quando a atividade residual está abaixo do limiar crítico de 10 % da atividade enzimática normal. Vários distúrbios associados com acúmulo de diferentes moléculas nos lisossomos, geneticamente determinados, heterogêneos, metabólicos ou adquiridos, são classificados como doenças do armazenamento lisossomal (KING & ALROY, 2000).

Essas patologias podem ser herdadas ou adquiridas, possuem diferentes manifestações clínicas e podem acometer mamíferos e aves (WARREN & ALROY, 2000).

2.1.1. Fisiopatogenia das doenças do armazenamento lisossomal

Acúmulo, ou armazenamento lisossomal, designa uma alteração celular na qual quantidades aumentadas de moléculas orgânicas, que normalmente são degradadas, acumulam-se nos lisossomos das células resultando, por fim, em morte celular. Essas doenças foram originariamente interpretadas como consequência de mutações que resultavam em redução da síntese das enzimas lisossômicas. Atualmente são conhecidos nove diferentes mecanismos causadores da doença do armazenamento lisossômico (Tabela 1). Portanto, a caracterização de distúrbios lisossomais foi ampliada de modo a incluir qualquer proteína que seja essencial para a função do lisossomo (CARLTON & McGAVIN, 1998).

Tabela 1. Mecanismos envolvidos nas doenças do armazenamento lisossomal.

Mecanismos	Exemplos
Distúrbios em que não é sintetizada uma enzima imunologicamente detectável. São as condições em que há genes estruturais nitidamente anormais.	Doenças de Hurler, Tay-Sachs, Sandhoffe e Pompe.
Distúrbios em que é sintetizado um polipeptídeo cataliticamente inativo. A mutação também pode afetar a estabilidade ou transporte do polipeptídeo.	Gangliosidose GM ₁ , mucopolissacaridose VI, doenças de Pompe e Tay-Sachs.
Distúrbios em que é sintetizada uma enzima cataliticamente ativa mas a enzima não é segregada para o interior dos lisossomos.	Doença da célula I, polidistrofia pseudo-Hurler.
Distúrbios em que é sintetizada uma enzima cataliticamente ativa mas a enzima é instável em compartimentos pré-lisossômicos ou lisossômicos.	Leucodistrofia metacromática de surgimento tardio, deficiência de múltiplas sulfatases, doença de Pompe de surgimento tardio, deficiência de neuraminidase, β -galactosidase.
Distúrbios em que faltam proteínas ativadoras (saposinas) de hidrolases degradadoras de lipídeos.	Variante AB da gangliosidose BM ₂ , variantes das doenças de Gaucher e Farber, variante juvenil da leucodistrofia metacromática.
Distúrbios em que o gene estrutural para as hidrolases está normal mas ocorre uma mutação no gene ou genes que codificam a modificação pós-translacional das hidrolases.	Deficiências de múltiplas sulfatases.
Distúrbios em que deficiências enzimáticas resultam da intoxicação com inibidores naturais ou sintéticos das enzimas lisossômicas.	Doença do alcalóide indolizidina (i.e., swainsonina), doença induzida por medicamentos anfílicos catiônicos (i.e., amiodarona, cloroquina).
Distúrbios causados por uma diminuição no transporte do produto final da degradação (i.e., ácido siálico livre, cistina livre) para fora dos lisossomos	Doença de Salla, Sialidose infantil, Cistinose
Distúrbios causados pelo aporte excessivo de substrato.	Algumas leucemias que estão associadas a células de Gaucher.

Adaptado de: KING & ALROY, 2000.

2.1.2. Doenças do armazenamento lisossomal adquiridas

As doenças do armazenamento adquiridas ocorrem após intoxicação (por plantas), acúmulo de ferro (como por exemplo, hemossiderina após hemólise) e acúmulo de cobre de origem exógena. A ceróide-lipofuscinose é uma doença de armazenamento lisossomal que tem várias formas de apresentação. Sua disfunção lisossomal ainda não foi completamente caracterizada. A doença lembra outros armazenamentos lisossomais por ter um modo recessivo de hereditariedade, mas difere por não ter efeito dependente da dose genética ou um defeito enzimático já demonstrado (CARLTON & McGAVIN, 1998).

2.1.3. Doenças do armazenamento lisossomal hereditárias

A tabela 2 classifica as principais doenças do armazenamento lisossomal hereditárias que afetam o sistema nervoso central dos animais.

Tabela 2. Doenças do armazenamento lisossomal de interesse veterinário, que afetam o sistema nervoso central

Doença	Produto armazenado	Enzima deficiente	Espécie	Raça
Gangliosidose GM ₁	Gangliosídeo GM ₁	β-galactosidase	Bovina Canina Felina Ovina	Holandesa Beagle Siamês Suffolk
Gangliosidose GM ₂	Gangliosídeo GM ₂	β-hexosaminidase	Caninos Felinos Suínos	Pointer Korat Yorkshire
α-manosidose	Oligossacarídeos associados a manose	α-manosidase	Bovinos Felinos	Angus Persa
β-manosidose	Oligossacarídeos associados a manose	β-manosidase	Caprinos Bovinos	Nubianos Salers
Ceróide-lipofuscinose	Ceróide-lipofuscina	Desconhecida. Hipóteses: (1) aumento da peroxidação lipídica (2) deficiência da peroxidase mediada por P-fenilene-diamina (3) aumento nos níveis de dolicol ou doliquil-fosfato (4) acúmulo da subunidade e da ATP sintetase	Caninos Felinos Ovinos Bovinos Primatas	Setter Inglês, Dachshund, Chihuahua, Cocker Spaniel Siamês Hampshire Down Beefmaster <i>Macaca fascicularis</i>

Adaptado de: CARLTON & McGAVIN, 1998.

2.1.4. A α -manosidose

A α -manosidose é a doença do armazenamento lisossomal, de interesse veterinário, mais comum e importante economicamente. Essa patologia é causada pela deficiência lisossomal da enzima α -manosidase, que é responsável por catabolizar vários oligossacarídeos e determinadas glicoproteínas. Como consequência, ocorre o acúmulo nos lisossomos de vários oligossacarídeos contendo manose. A forma hereditária foi descrita inicialmente em bovinos da raça Angus na Nova Zelândia, Austrália, Escócia, América do Norte e Argentina. Na Nova Zelândia, mais de 10% dos animais dessa raça são heterozigotos para esse defeito enzimático, o que dificulta os programas de controle dessa patologia. A α -manosidose hereditária ocorre também em bovinos Murray Grey e Galloway - raça mestiça Angus na Escócia. Os defeitos moleculares para o gado Angus e Galloway são diferentes (JOLLY & WALKLEY, 1997).

A α -manosidose também ocorre na espécie felina. Ela foi descoberta em 1980, na raça Short-hair na Inglaterra e, a seguir, na raça persa na Suíça, América do Norte e Bélgica (MAENHOUT et al., 1988; JOLLY & WALKLEY, 1997). Posteriormente surgiram muitos relatos sobre essa doença em felinos, com diferenças entre a apresentação clínica, reforçando a hipótese de se tratar, aparentemente, de um distúrbio causado por múltiplos defeitos genéticos (JOLLY & WALKLEY, 1997).

Um tipo de α -manosidose adquirida é causada por plantas dos gêneros *Swainsona* sp., *Oxytropis* sp., *Astragalus* sp., *Ipomoea* sp. (RADOSTITS et al., 2000) e *Sida carpinifolia* (COLODEL et al., 2002; DRIEMEIER et al., 1998; LORETTI et al., 1999). Todas as espécies que causam esta patologia possuem como princípio ativo a swainsonina. A α -manosidose adquirida difere da patologia hereditária pois, além de inibir a enzima α -manosidase lisossomal, inibe também a α -manosidase II do complexo de Golgi (JOLLY & WALKLEY, 1997; MOREMEN, 2002).

O gênero *Astragalus* sp. possui aproximadamente 300 espécies e as espécies que são tóxicas se dividem em três grandes grupos, de acordo com suas características químicas: os que contêm radicais nitrogenados, os que acumulam selênio e os do tipo “locoweed” (gêneros *Astragalus* sp. e *Oxytropis* sp.). Este termo é formado pela junção de duas palavras: “loco” (do espanhol = louco) e “weed” (do inglês = erva daninha). O termo foi empregado primeiramente pelos

conquistadores espanhóis na América do Norte, ao verem seus cavalos com sinais de distúrbios neurológicos (“loco”), após consumirem tais plantas (“weed”). As plantas dos gêneros *Astragalus* e *Oxytropis* possuem ações tóxicas semelhantes (CARLTON & McGAVIN, 1998; JAMES et al., 1981; JOLLY & WALKLEY, 1997). Os principais danos causados pela intoxicação pelas “locoweeds” são: alterações neurológicas, emaciação, alteração no comportamento, problemas reprodutivos (aborto, teratogenia, interferência na espermatogênese e oogênese) (SHARMA et al., 1984).

As “locoweeds” são tidas como as mais danosas de todas as plantas tóxicas. As espécies conhecidas atualmente são: *A. lentiginosus*, 36 variedades; *A. mollissimus*, 11 variedades; *A. wootonii*, duas variedades; *A. thurberi*; *A. nothoxys*; *Oxytropis sericea*; *O. lambertii*; e *O. soximontana*, porém a toxicidade de todos os gêneros e suas variedades ainda não foram comprovadas (JAMES et al., 1981).

Existe uma grande prevalência de insuficiência cardíaca congestiva em rebanhos de bovinos que consomem *Oxytropis sericea* em grandes altitudes (de 2.100 a 3.000 metros acima do nível do mar). Nessas condições, a intoxicação por *locoweeds* se desenvolve de forma diferente da observada em condições naturais e descrita na literatura. Os principais sinais apresentados referem-se à insuficiência cardíaca congestiva (depressão, diarréia escura e fluida, edema nas partes ventrais do corpo, veia jugular ingurgitada, tremores musculares, manifestações clínicas de cansaço, resistência ao exercício reduzida, respiração laboriosa, desidratação e morte em poucos dias). Os achados de necropsia nestes casos são: hipertrofia e dilatação ventricular direita, edema subcutâneo submandibular, ascite, hidrotórax, diarréia escura líquida profusa, variados graus de atelectasia ou consolidação pulmonar e congestão hepática passiva crônica. Na histologia, as principais lesões são a vacuolização citoplasmática neuro-visceral e a congestão hepática passiva crônica (JAMES et al., 1986).

Três eqüinos que consumiram *Astragalus mollissimus* apresentaram sinais clínicos neurológicos. Estes sinais clínicos consistiam de: incoordenação, dificuldade de apreensão e mastigação dos alimentos, excitação quando manuseados, agressividade, coma e morte. Todos apresentaram perda progressiva de peso, apesar de apresentarem apetite voraz (KIRKPATRICK & BURROWS, 1990).

Astragalus lentiginosus possui ainda um análogo da swainsonina que é a swainsonina N-óxido que da mesma forma inibe as enzimas α -manosidase e α manosidase II do complexo de Golgi (CARLTON & McGAVIN, 1998; MOLYNEUX & JAMES, 1982).

Infertilidade, abortos e nascimento de animais fracos têm sido freqüentemente descritos nas intoxicações por plantas que contêm swainsonina (HARTLEY & JAMES, 1975; PANTER et al., 1987).

As ovelhas prenhes que consomem as leguminosas do tipo “locoweeds” apresentam problemas reprodutivos variados, de acordo com a idade gestacional, que são: abortos, natimortos, cordeiros fracos ao nascer, malformações como hiper-extensão do jarrete, artrogripose carpal e contração de tendões (que são reversíveis) e graves malformações esqueléticas (irreversíveis). Essas observações foram feitas ainda sem se saber exatamente qual o princípio ativo destas plantas (JAMES et al., 1967; JAMES & KEELER, 1969). Foi constatado também que as lesões microscópicas na tireóide, rim, fígado e adrenal dos neonatos eram idênticas às observadas em animais adultos. As lesões neurológicas não foram observadas nos neonatos (JAMES, 1971; HARTLEY & JAMES, 1973). Essas lesões são causadas possivelmente pelas alterações observadas na placenta, cujo principal é a vacuolização citoplasmática das membranas fetais, principalmente do epitélio coriônico, além de hemorragias na placenta, devido à pouca vascularização uterina e ao menor tamanho dos cotilédones (JAMES, 1972).

Nos animais adultos, as lesões microscópicas causadas pela intoxicação por “locoweeds” são: vacuolização nas células dos túbulos renais, vacuolização das células de Purkinje do cerebelo e em outros neurônios do sistema nervoso central, vacuolização na tireóide, pâncreas, linfonodos e linfócitos. São observados, ainda, esferóides axonais em muitas áreas do cérebro e vacuolização na placenta de ovelhas intoxicadas e em vários órgãos dos fetos (JAMES et al., 1981).

Foi realizado um estudo para determinar o desenvolvimento e persistência das lesões causadas por *A. lentiginosus* em ovelhas prenhes e seus fetos. Treze ovelhas prenhes consumiram 400 gramas da planta (seca e peletizada), durante 30 dias (dos dias 70 a 100 de gestação) e depois foram eutanasiadas e necropsiadas aos 100, 115, 130 e 145 dias de gestação. Foi observado aborto no terço final da gestação (aos 92 e 120 dias); nas ovelhas eutanasiadas aos 100 dias foi observado ascite (inclusive no feto); um feto com 115 dias de gestação apresentou coração muito aumentado, escroto duplo e *atresia ani*; e um feto aos 145 dias de idade

estava edematoso. As tireóides de todos os fetos intoxicados estavam bem maiores do que os fetos controle. A maior incidência de lesões foi observada aos 100 dias (quando as ovelhas pararam de comer a planta), o que indica que os danos causados são reversíveis. As principais lesões nas ovelhas foram: vacuolização neuronal em todo sistema nervoso central, nos túbulos renais, nos linfócitos, nos macrófagos, no parênquima exócrino do pâncreas, no epitélio acinar da tireóide, nas células do corpo lúteo e ainda distrofia neuroaxonal; nas placentas: vacuolização do epitélio coriônico, no epitélio trofoblástico e presença de células sinciciais; nos fetos: distrofia neuroaxonal e vacuolização em neurônios do sistema nervoso central, túbulos renais, macrófagos do linfonodo, macrófagos do baço, parênquima exócrino do pâncreas e epitélio acinar da tireóide (HARTLEY & JAMES, 1975).

As plantas do gênero *Ipomoea* sp. (Convolvulaceae) ocorrem nos continentes Americano, Africano e Asiático. A *I. carnea*, sin: *I. fistulosa* (manjorana, canudo ou mata-cabra) e a *I. asarifolia* (batatarana ou salsa) são responsáveis por grandes perdas econômicas em rebanhos de bovinos, ovinos e caprinos (ARMIÉN, 2000; MÉNDEZ & RIET-CORREA, 2000).

Pelas características de seus ramos e flores rosadas, a *I. carnea* foi levada da América do Sul para a Índia, para fins ornamentais. Sua fácil propagação, crescimento rápido e cultivo extensivo foram responsáveis pelo seu consumo e posterior morte dos bovinos (MISRA & MISRA, 1965).

A *I. carnea* é encontrada em áreas alagadiças e margens de rios. Por se manter verde durante todo o ano, durante as épocas de escassez de pastagens os animais (geralmente os mais jovens) a consomem em grandes quantidades, durante vários dias ou semanas. Quando intoxicados, os animais apresentam ataxia, hipertermia, tremores musculares, sonolência e emaciação progressiva. Os ovinos possuem uma evolução subaguda ou crônica. Os sintomas continuam durante alguns dias após cessar a ingestão da planta e somente morrem os que continuam a ingerir a planta após apresentarem os sinais clínicos. Além da swainsonina, a *Ipomoea* sp. possui como princípios tóxicos a calistegina B₂ e a calistegina C₁ que são alcalóides inibidores de glicosidases. Os principais achados de necropsia em animais intoxicados por *Ipomoea* sp. são emaciação progressiva e, em alguns casos, discreta anemia. Histologicamente, observa-se vacuolização citoplasmática no sistema nervoso central e autônomo, com degeneração axonal

no cérebro, formando esferóides, necrose das células da glia e astrogliose. Há também vacuolização em células parenquimatosas do pâncreas, fígado, tireóide, testículo e macrófagos (ARMIÉN, 2000; BALOGH et al., 1999; MÉNDEZ & RIET-CORREA, 2000).

As calisteginas foram identificadas primeiramente em plantas das famílias Convolvulaceae, Solanaceae e Moraceae. A presença destes alcalóides e da swainsonina em uma mesma planta foi descrita em duas espécies do gênero *Ipomoea* em uma área restrita da Austrália (*I. sp. Q6* [aff. *calobra*] ou “Weir vine” e *I. polpha*). A “weir vine” foi associada com indução da doença do acúmulo lisossomal em animais ruminantes (BALOGH et al., 1999; MOLYNEUX et al., 1995).

Nas sementes da “weir vine” foram encontrados 0,048% de swainsonina e 0,058% de calistegina B₂. Nas sementes da *I. polpha* foram encontrados 0,107% de swainsonina e 0,025% de calistegina B₂. Estudos com extratos alcalóides *in vitro* demonstraram sensível inibição de certas hidrolases, como: α -manosidase, β -glucosidase e α -galactosidase (MOLYNEUX et al., 1995).

Análises histológicas no sistema nervoso central de um ovino e dois bovinos, que morreram após intoxicação pela “weir vine”, revelaram axônios tumefeitos e vacuolização neuronal, semelhantes às lesões observadas em animais intoxicados por plantas que contém swainsonina. Esses resultados indicam que a intoxicação por “weir vine” é uma doença do acúmulo lisossomal induzida (α -manosidose), possivelmente exacerbada pela inibição da β -glucosidase e da α -galactosidase pela calistegina B₂ (MOLYNEUX et al., 1995).

Segundo estudos, as “locoweeds” que contém ao menos 0,001% de swainsonina podem causar danos neurológicos. A swainsonina, por possuir uma extraordinária capacidade de inibir a α -manosidase, produz quadros de intoxicação em ruminantes, sem que grandes quantidades das plantas sejam consumidas. Nesses casos, o mais importante é o consumo contínuo e prolongado da planta, para que a atividade enzimática seja suprimida e desenvolva a vacuolização celular característica da intoxicação (BALOGH et al., 1999).

No século XIX, produtores rurais do leste da Austrália observaram que plantas do gênero *Swainsona* sp. eram tóxicas para ovinos. Através de reprodução

experimental em ovelhas foi observado que *Swainsona galegifolia* causava sinais clínicos semelhantes aos observados à campo. Posteriormente, constatou-se que *Swainsona luteola* também era tóxica para ovinos, bovinos e eqüinos. Observações de campo e experimentais revelaram que os ovinos que consumiam a planta por um período de tempo maior eram os que apresentavam alterações clínicas mais evidentes e, conseqüentemente, lesões histológicas mais marcadas. Os sinais clínicos apresentados eram: ataxia e tremores musculares após exercício, cegueira parcial, opistótono e emaciação. Não foram observadas alterações na necropsia e histologicamente havia vacuolização citoplasmática nos neurônios do cérebro, no corno ventral da medula espinhal, nos neurônios de gânglios autônomos, nas células dos túbulos renais e nos linfonodos (LAWS & ANSON, 1968; RADOSTITS et al., 2000).

Um dos primeiros experimentos utilizando *Swainsona galegifolia* (nome popular: “Darling pea”) foi realizado em cobaias (*Cavia porcellus*) durante três a quatro semanas e foi observado que as alterações celulares presentes eram quase idênticas às encontradas em ovinos naturalmente intoxicados (HUXTABLE, 1969). As principais alterações neuronais observadas foram: tumefação e vacuolização do citoplasma neuronal, com discretos grânulos de Nissl. Os núcleos dos neurônios tendem a permanecer no centro da célula e ocasionalmente se apresentam levemente enrugados. Também foram observados vacúolos nos hepatócitos, nas células acinares pancreáticas, nos fagócitos mononucleares da polpa vermelha do baço, nos macrófagos medulares dos linfonodos mesentéricos e nas células tubulares epiteliais do córtex renal (HUXTABLE, 1969).

Após cessar o consumo de plantas com swainsonina, o nível sérico da enzima α -manosidase e o nível urinário de excreção de oligossacarídeos retornam ao normal em aproximadamente uma semana (DANIEL et al., 1984; STEGELMEIER et al., 1995).

2.2. *Sida carpinifolia*

2.2.1. Aspectos botânicos e biológicos

2.2.1.1. Classificação botânica: *Sida carpinifolia* L.f. (Sinonímia: *Sida acuta* var. *carpinifolia* (L. f.) K. Schum.) é uma angiosperma que pertence à família Malvaceae. É popularmente conhecida como malva-baixa, guaxima, malva-brava,

relógio-de-vaqueiro, relógio-vassoura, tupitixá, guanxuma, guanxuma-preta, chá-do-reino, chá-da-índia, vassoura, vassoura-preta, vassourinha, sida ou tupichá (LORENZI, 2000b; HENRIQUES et al., 1989). É uma planta subarborescente, muito ramificada, de caule sublenhoso com casca fibrosa, perene, ereta, com 0,3 até 1 m de altura. A planta é nativa do continente americano e possui distribuição pantropical, cresce espontaneamente e com vigor em solos semi-arenosos, em locais úmidos e sombreados nos arredores dos matos, currais, estábulos e terrenos baldios. No Brasil, se distribui nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo mais freqüente na planície litorânea. Esta planta tem sua floração nos meses de março e abril, se reproduz apenas por meio de sementes, sendo considerada uma importante planta daninha na agricultura (LORENZI, 2000a; BACCHI et al., 1982).

Suas folhas são coriáceas, dísticas, oval-lanceoladas, bordos pardo-escuros, serrados irregularmente até quase a base do pecíolo. As estípulas são dimorfas, sendo uma delas espatulada e a outra filiforme. As flores amarelas axilares são geminadas, em glomérulos ou em pequenos ramos. O pedúnculo cilíndrico é menor ou igual ao pedúnculo correspondente. O cálice globoso apresenta minúsculos pêlos simples, longos, semelhantes a cílios, nos bordos que são também pardo-escuros. As pétalas amarelas assimétricas têm pêlos glandulares e tufo de pêlos na base. O ovário tem sete carpelos. O carpódio é biaristado, trígono e reticulado nas três faces. Cristas de 1 a 2,5 mm de comprimento, semente quase globosa, marrom-escura, glabra, medindo de 1,5 a 2,0 mm de comprimento (HENRIQUES et al., 1989; KISSMANN & GROTH, 1995).

2.2.1.2. Princípio ativo: a substância tóxica presente na *Sida carpinifolia*, responsável pela α -manosidose, é o alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol (Figura 1). Ela foi detectada em amostras da planta, na concentração de 0,006%, na base da matéria seca (COLODEL et al., 2002b). Esta substância foi identificada apenas em 1982, na Austrália, após ter sido determinada como substância ativa da planta leguminosa *Swainsona canescens* (HARRIS et al., 1988) e, por isso, denominada de swainsonina. Alguns autores utilizam, em português, o termo esvainsonina para esta toxina (OSWEILER, 1998). A *Swainsona canescens* é uma leguminosa responsável por causar consideráveis perdas econômicas na Austrália (DORLING et al., 1980) assim como outras plantas tóxicas com mesmo princípio ativo no oeste dos Estados Unidos (*Astragalus* sp. e *Oxytropis* sp.) (KINGSBURY, 1964) e em Moçambique (*Ipomoea carnea*) (BALOGH et al., 1999). No Brasil, o único

gênero conhecido por possuir swainsonina, além da *S. carpinifolia*, é o *Ipomoea* sp. (*Ipomoea carnea* sp. *fistulosa* e *I. asarifolia*) (ARMIÉN, 2000; MÉNDEZ & RIET-CORREA, 2000; TOKARNIA et al., 1960; TOKARNIA et al., 2000).

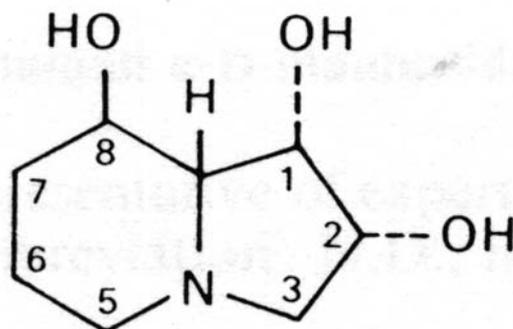


Figura 1. Fórmula química do alcalóide 1,2,8-triol indolizidina (swainsonina).

Há estudos que indicam que os fungos *Rhizoctonia leguminicola* e *Metarhizium anisopliae* sejam também capazes de produzir swainsonina (HARRIS et al., 1988). Esses fungos se desenvolvem em pastos ou feno de alfafa ou trevo vermelho e produzem um outro alcalóide indolizidínico quimicamente análogo a swainsonina, conhecido por slaframina (MOLYNEUX & JAMES, 1982) que causa salivação intensa (“slobbering syndrom”) em herbívoros na América do Norte (KNIGHT & WALTER, 2003, MOLYNEUX & JAMES, 1982). Os únicos três alcalóides indolizidínicos conhecidos por possuir alguma atividade fisiológica sobre os animais são: swainsonina, swainsonina N-óxido e slaframina (MOLYNEUX & JAMES, 1982).

Aparentemente, as plantas que possuem ao menos 0,001% de swainsonina podem causar danos neurológicos em caprinos, se o consumo destas plantas for regular e por um determinado período (BALOGH et al., 1999).

Experimentos com animais, utilizando swainsonina, podem servir como modelos para pesquisa em α -manosidose hereditária em humanos (HUXTABLE & DORLING, 1982), assim como o estudo direto sobre a α -manosidose hereditária autossômica recessiva do gado angus (JOLLY, 1974).

Por causa da sua diversa atividade biológica (foi o primeiro inibidor do processamento das glicoproteínas selecionado para testes clínicos em oncologia, pois inibe o crescimento de tumor e a formação de metástases e ainda exerce atividade imunomoduladora), e também devido ao alto custo de obtenção da

swainsonina de fontes naturais, busca-se sintetizar este importante alcalóide, e análogos, em laboratório (PEARSON & HEMBRE, 1996a; PEARSON & HEMBRE, 1996b).

A ingestão de swainsonina em plantas, ao redor de 50% da dieta diária (na base da matéria seca) durante seis a oito semanas induz a doença clínica neurológica em ovinos, bovinos e eqüinos (HUXTABLE & DORLING, 1982).

2.3.1.3. Toxicocinética na espécie ovina: depois de ingerida, a swainsonina (hidrossolúvel) é rapidamente absorvida pelo trato gastrintestinal. Ela se distribui por todos os tecidos, sendo que a concentração encontrada no fígado e rins é de duas a quatro vezes superior à encontrada nos demais órgãos e tecidos, em animais expostos à toxina (STEGELMEIER et al., 1995; STEGELMEIER et al., 1999).

Ela é também rapidamente excretada na urina, leite e fezes e possui uma meia-vida plasmática curta, de aproximadamente vinte horas (STEGELMEIER et al., 1995; STEGELMEIER et al., 2001). Por esse motivo, após cinco a seis dias com dieta adequada (sem a swainsonina), a toxina não está mais presente em animais previamente intoxicados. Isso sugere que o reparo celular inicia logo que o consumo da toxina cessa; contudo, a disfunção das células pode permanecer por dias ou semanas, assim como as mortes de neurônios podem resultar em disfunções neurológicas permanentes (STEGELMEIER et al., 1995).

2.2.1.4. Mecanismo de ação: a swainsonina é um potente inibidor das enzimas α -manosidase lisossomal e α -manosidase II do aparelho de Golgi, causando alterações no processamento de glicoproteínas e conseqüente acúmulo de oligossacarídeos intracelulares. Essa inibição ocorre, provavelmente, devido à sua semelhança estrutural ao estado de transição para a hidrólise das ligações de manose nos oligossacarídeos (WINCHESTER, 1984). Isso prejudica a atividade metabólica intracitoplasmática, e causa a morte da célula (AGAMANOLIS, 1995; BALOGH et al., 1999; STEGELMEIER et al., 1995; WINCHESTER, 1984).

2.2.2. Dados epidemiológicos

Primeiramente, foi observada uma doença neurológica em um rebanho de caprinos. Nesse rebanho havia uma alta taxa de abortos (sete ocorridos em 45 dias) e natimortos. Os animais pastavam em uma área de aproximadamente cinco hectares, na qual havia predominância de *S. carpinifolia*. Essa patologia foi caracterizada como doença de armazenamento lisossomal e como α -manosidose

pela histoquímica com lectinas. Essa doença foi reproduzida em caprinos com a administração *S. carpinifolia* por via oral (COLODEL et al., 2002a).

Posteriormente, foi observado um surto de intoxicação natural por *Sida carpinifolia* em eqüinos (pôneis). Havia onze animais no rebanho; três adoeceram, um morreu e foi posteriormente necropsiado. A evolução clínica foi de 24 horas e os sinais clínicos consistiam em tremor muscular, dor abdominal e morte. Os estudos patológicos e pela histoquímica de lectinas coincidem com os da intoxicação por *S. carpinifolia* em caprinos (GIMENO et al., 2001; LORETTI et al., 2003).

2.2.3. Sinais clínicos

Animais intoxicados por *Sida carpinifolia* apresentam sinais clínicos similares aos animais intoxicados por outras plantas que possuem swainsonina (COLODEL et al., 2002a; COLODEL et al., 2002b; DRIEMEIER et al., 1998b; DRIEMEIER et al., 2000). Esses sinais clínicos são progressivos e refletem fundamentalmente as alterações degenerativas no sistema nervoso central, tais como: incoordenação, dismetria, hiperestesia, tremores musculares, cambaleio, deficiências propioceptivas, quedas, depressão e emaciação (BALOGH et al., 1999; MOLYNEUX & JAMES, 1982; TOKARNIA et al., 2000). Alterações reprodutivas em ovinos, caracterizadas por diminuição na fertilidade, teratogenicidade e abortos durante a metade final da gestação, têm também sido relatados (JAMES et al., 1981, OSWEILER, 1998). Eqüinos podem se tornar agressivos e reagir violentamente a pequenos estímulos (OSWEILER, 1998; KIRKPATRICK & BURROWS, 1990).

2.2.4. Achados de necropsia

Não foram encontradas lesões macroscópicas significativas em eqüinos, apenas uma moderada distensão do ceco e cólon maior, que continham grande quantidade de conteúdo alimentar (GIMENO et al., 2001. LORETTI et al., 2003; LORETTI et al., 1999).

Em caprinos, nos casos de intoxicação natural, foram observados apenas emaciação e úlceras cutâneas provocadas pelo decúbito (DRIEMEIER et al., 2000a), ou ausência de lesões significativas (COLODEL et al., 2002a).

2.2.5. Achados histopatológicos

O exame histológico evidenciou a presença de tumefação de neurônios, que tinham o citoplasma preenchido por múltiplos vacúolos que conferiam um aspecto espumoso. Essa lesão afetava os neurônios do cérebro, cerebelo, medula espinhal em caprinos e eqüinos (DRIEMEIER et al., 2000a; COLODEL et al., 2002a; LORETTI et al., 2003) e neurônios do gânglio trigêmeo, gânglio celíaco, plexo submucoso e mioentérico dos intestinos em eqüinos (LORETTI et al., 2003). Vacuolizações citoplasmáticas foram descritas nos hepatócitos, nas células dos túbulos contorcidos proximais e nas células foliculares da tireóide (DRIEMEIER et al., 1998b).

2.2.6. Histoquímica das lectinas

As lectinas são proteínas e glicoproteínas, de origem não imunológica, que possuem a capacidade de se ligar a açúcares específicos. Colorações com glicoconjugados em cortes de tecidos animais embebidos em parafina permitem a identificação de resíduos de carboidratos nas glicoproteínas ou oligossacarídeos que estão retidos no corte, permitindo a caracterização da doença de armazenamento. As células dos pacientes positivos para α -manosidose coram com aglutinina de *Concanavalia ensiformis* (Con A), aglutinina de germen de trigo (“wheat germ agglutinin” - WGA) e aglutinina de germen de trigo succinilado (“succinylated wheat germ agglutinin” - s-WGA). O padrão de coloração é similar tanto na α -manosidose adquirida (tóxica) como na hereditária (WARREN & ALROY, 2000).

2.2.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Ultra-estruturalmente, em casos de intoxicação por *Sida carpinifolia*, observaram-se vacúolos ligados à membrana, em alguns dos quais havia um material granulado e figuras mielinóides no citoplasma dos hepatócitos, das células de Kupffer, das células pancreáticas acinares, dos neurônios (principalmente nas células de Purkinje) e dos neurônios pequenos da camada granular do córtex cerebral. Também foram vistos, nesta camada, esferóides axonais preenchidos com corpos densos e corpos túbulo-vesiculares (DRIEMEIER et al., 2000).

2.2.8. Diagnóstico

O diagnóstico das doenças de acúmulo das glicoproteínas, adquiridas ou

herdadas, pode ser realizado através da análise dos oligossacarídeos presentes na urina, pelo método de cromatografia de camada fina (“thin layer chromatography” - TLC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (“high performance liquid chromatography” - HPLC). Nos casos de intoxicação por swainsonina, esses exames podem ser repetidos para monitorar a progressão da doença (WARREN & ALROY, 2000).

2.2.9. Diagnóstico diferencial

A doença clínica e os achados histológicos precisam ser diferenciados de outras enfermidades levando em conta, principalmente, o histórico e a presença dos agentes suspeitos na alimentação dos animais.

Algumas plantas, toxinas e tumores causam achados clínicos semelhantes, tais como *Claviceps paspali*, (*Paspalum notatum*, *P. vaginatum*, *P. dilatatum*), *Phalaris* spp., *Solanum fastigiatum*, *Diplodia maydis*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perene*, *Prosopis juliflora*, *Hallimium brasiliense*, tumores (neuroblastoma cerebelar, meningioma) (MÉNDEZ & RIET-CORREA, 2000; MEUTEN, 2002; PAULOVICH et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2001; TABOSA et al., 2000).

Scrapie é uma patologia importante a ser considerada. É uma encefalopatia espongiiforme, causada por uma partícula protéica infectante denominada príon. Esta proteína causa vacuolização no citoplasma dos neurônios e de seus prolongamentos. O ovino doente apresenta sinais clínicos neurológicos e coceira. O diagnóstico definitivo é realizado somente através da histopatologia ou imunoistoquímica (RIET-CORREA et al., 2001). Os vacúolos neuronais causados pelo príon são espaços vazios vistos na hematoxilina-eosina, diferentes dos vacúolos causados pela swainsonina, que são pequenos e numerosos, conferindo um aspecto granular dos citoplasmas as células acometidas.

2.2.10. Tratamento e profilaxia

Os animais devem ser removidos de locais infestados pela planta e devem ser tomadas medidas para reduzir a planta na propriedade (p. ex., pelo manejo de pastagem e herbicidas apropriados) (OSWEILER, 1988; LORENZI, 2000a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimentos gerais

A *Sida carpinifolia* foi coletada em grande quantidade, entre setembro e dezembro de 2001, na Escola Técnica de Agricultura (ETA) em Viamão – RS (Figuras 2 e 3). Para ser oferecida no cocho aos animais, a planta foi secada à sombra e moída em moinho martelo (com peneira 8 mm). Todo o consumo diário foi pesado, inclusive as perdas (resíduos que sobravam dentro e ao redor dos cochos). Para o estudo experimental, foram utilizados sete ovinos, numerados de 1 a 7 entre seis meses e dois anos de idade, sendo três machos e quatro fêmeas, um Texel e os demais sem raça definida, oriundos de uma propriedade no município de Mostardas – RS, onde não havia *Sida carpinifolia*. Os animais foram utilizados simultaneamente no experimento.



Figura 2. *Sida carpinifolia* em floração, mês de janeiro de 2001, Porto Alegre, RS.



Figura 3. Local de coleta da *Sida carpinifolia* (março de 2001 - Viamão, RS).

Inicialmente, os ovinos foram alojados em baias individuais, adaptados ao novo ambiente, e foram desverminados com Endazol Cobalto[®] (albendazole, sulfato de cobalto e veículo q.s.p., laboratório IRFA), por via oral. Posteriormente, todos receberam *S. carpinifolia* curada à sombra e triturada, *ad libitum*, com controle do peso ingerido por animal/dia. A planta utilizada para todos animais foi coletada no mesmo local e época do ano. Adicionalmente, todos os animais receberam feno de alfafa, ração comercial (ração para ovino, peletizada, acondicionada em saco com aproximadamente 25 quilos, marca Ovino Criador – BUNGE[®], VITOSAN[®], Registro no Ministério da Agricultura sob nº RS 01008-00034, fabricante: Moinhos Santista Alimentos S.A.) e água à vontade. Exames clínicos diários consistiram de avaliação postural, movimentação e teste HR “*Head Raising test*” (PIENAAR et al., 1976). Esse teste consiste em estender caudo-dorsalmente a cabeça do animal em estação durante seis segundos e, em seguida, soltá-la rapidamente. Animais com alterações neurológicas,

especialmente cerebelares e vestibulares, demonstram os sinais clínicos exacerbados, podendo apresentar incoordenação motora e ataques epileptiformes quando submetidos a esse procedimento.

A fim de analisar a evolução das lesões, os ovinos foram eutanasiados e necropsiados, um a um, com intervalos pré-determinados, a saber: aos 30, 45, 75 e 100 dias. Um ovino morreu de causas naturais aos 18 e outro aos 53 dias. O ovino 6 teve sua dieta livre de *S. carpinifolia* após os 80 dias de consumo e foi necropsiado após outros 70 dias para avaliar regressões das alterações patológicas clínicas e estruturais. Os dados gerais sobre os ovinos utilizados no experimento estão listados na Tabela 3.

Foram utilizados, como controle, cinco ovinos que não consumiram *Sida carpinifolia*.

Tabela 3. Características gerais dos ovinos do experimento e período de consumo de *Sida carpinifolia*.

Ovino	Idade (meses)	Peso inicial (em kg)	Sexo	Período de consumo da <i>Sida carpinifolia</i>
1	6	16	Fêmea	18
2	6	17	Fêmea	30
3	6	18	Fêmea	45
4	8	19	Macho castrado	53
5	12	19	Fêmea	75
6	12	21	Macho castrado	80
7	24	85	Macho inteiro	100

3.1.1. Identificação botânica: as amostras da planta foram identificadas como *Sida carpinifolia* L.f., na Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

3.1.2. Análise bromatológica: uma amostra de *S. carpinifolia* fresca foi analisada (Tabela 4), para determinação dos seus valores nutricionais. O material foi remetido ao laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Agronomia – UFRGS.

Tabela 4. Análise bromatológica da *Sida carpinifolia*.

Análise bromatológica <i>Sida carpinifolia</i>		
	Matéria seca (%)	Seco ao ar (%)
Matéria seca	100,00	27,40
Umidade	-	72,60
Matéria orgânica	90,06	24,68
Proteína bruta	11,71	3,21
Fibra bruta	26,20	7,18
Extrato etéreo	2,96	0,81
Cinzas	9,94	2,72
Extrato não nitrogenado	49,19	13,48
NDT	61,91	16,96

3.2. Eutanásia

Os procedimentos de eutanásia foram realizados administrando Thionembutal[®] (Tiopental sódico) por via intravenosa, rápido e a efeito (BEAVER, 2001; BOOTH e McDONALD, 1992; MASSONE, 1999; Resolução nº. 714, em 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária).

3.3. Material coletado na necropsia

Foram coletados: sistema nervoso central, globo ocular, gânglio trigêmeo, gânglio celíaco, nervo ciático, linfonodos (mediastínicos, poplíteos, mesentéricos e hepáticos), coração, pulmão, baço, fígado, rim, medula óssea, bexiga, intestinos, rúmen, retículo, omaso, abomaso, traquéia, esôfago, testículo, epidídimo, ovário, útero, pele, pâncreas, hipófise, tireóide, adrenal, junção costo-condral e músculos esqueléticos (diafragma, reto-femoral e intercostais) e conservados em solução de formalina 10 % tamponada.

3.4. Cortes do sistema nervoso central

Para estudo do encéfalo, foram analisadas cinco seções frontais transversais (Figura 4):

Seção 1 - Córtex frontal sobre o corpo estriado e quiasma óptico (Figura 5).

Seção 2 - Córtex frontal sobre o tálamo e corpo mamilar (Figura 6).

Seção 3 - Córtex occipital sobre o colículo rostral do mesencéfalo (Figura 7).

Seção 4 - Cerebelo na altura do pedúnculo cerebelar caudal (Figura 8).

Seção 5 - Medula oblonga sobre óbex (Figura 9).

A medula espinhal foi avaliada, através de cortes transversais dos segmentos: cervical, intumescência cervical, torácico, lombar e intumescência lombar.

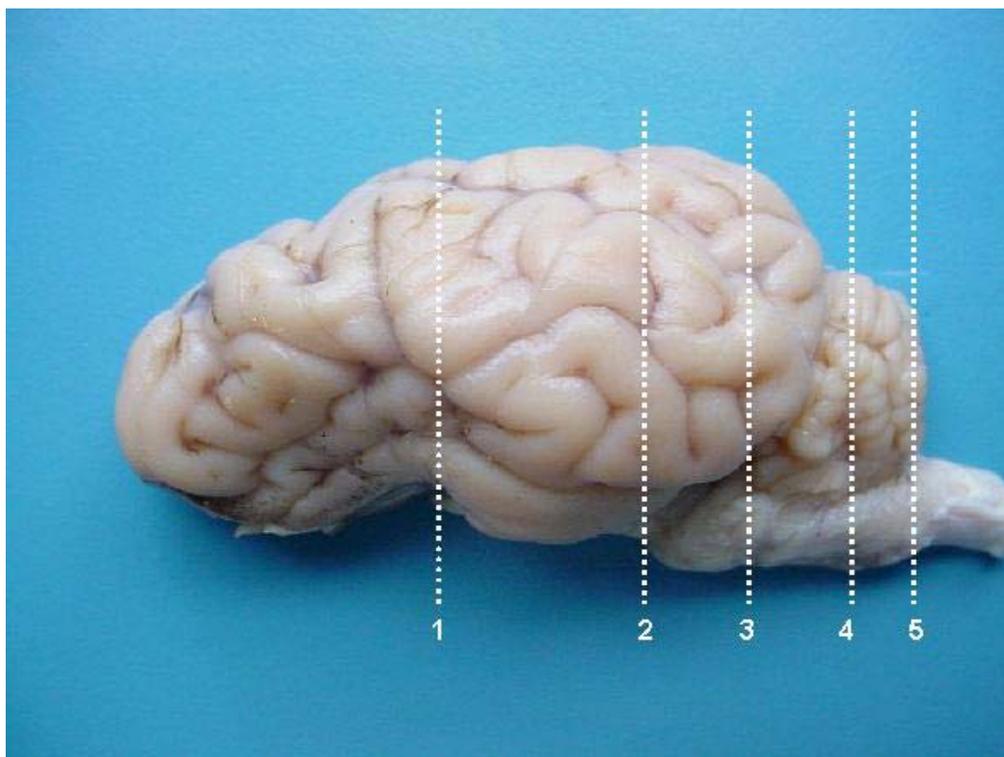


Figura 4. Cérebro ovino, visão lateral, seções selecionadas para exame histológico.

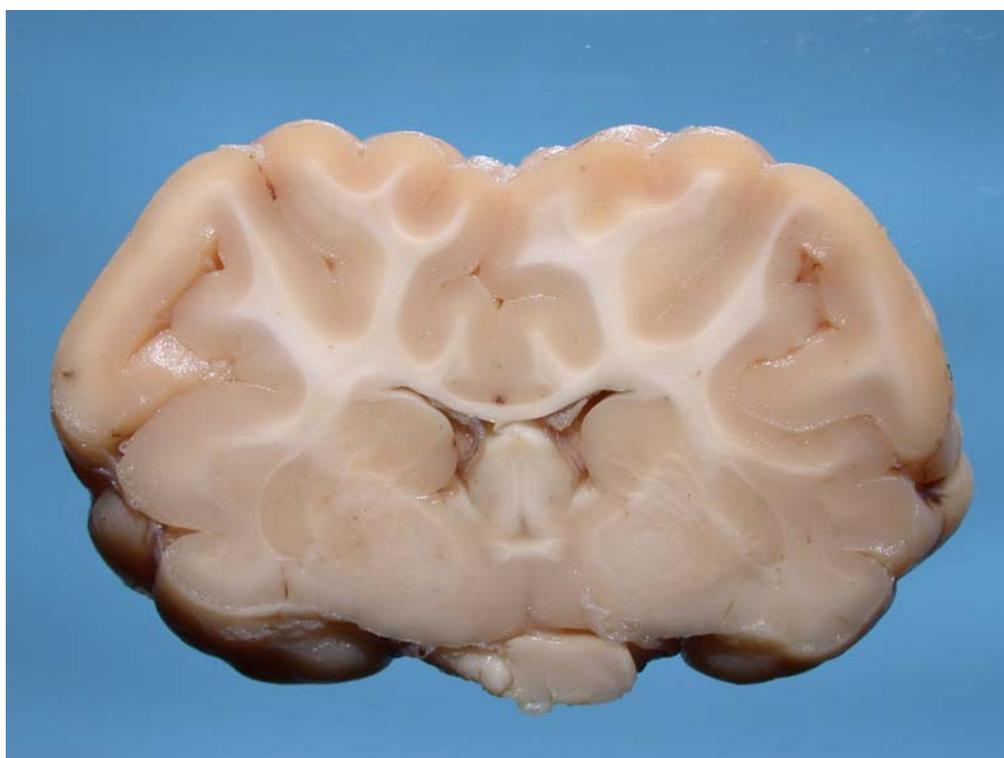


Figura 5. Seção 1 - Córtex frontal sobre o corpo estriado e quiasma óptico.

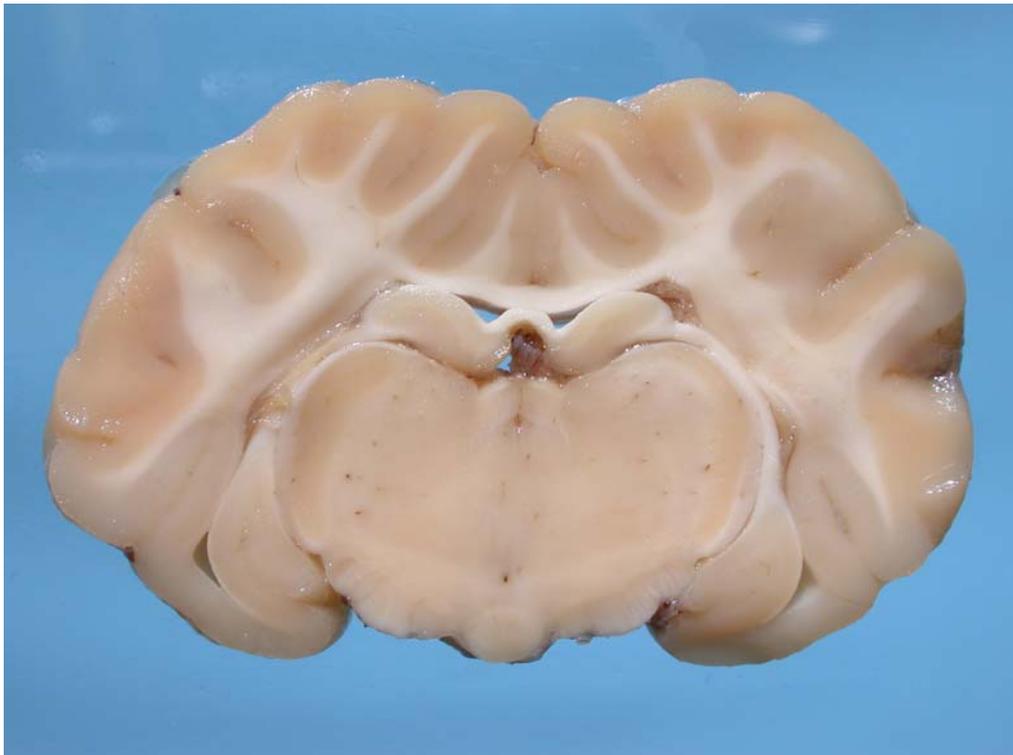


Figura 6. Seção 2 - Córtex frontal sobre o tálamo e corpo mamilar.

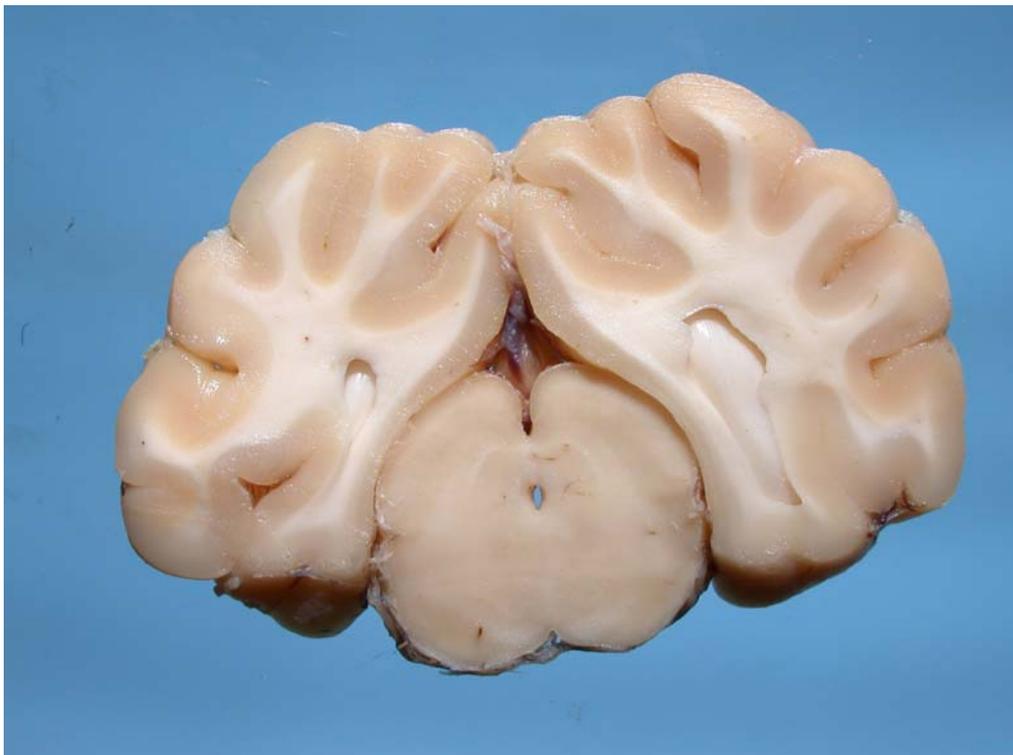


Figura 7. Seção 3 - Córtex occipital sobre o colículo rostral do mesencéfalo.



Figura 8. Seção 4 - Cerebelo na altura do pedúnculo cerebelar caudal.



Figura 9. Seção 5 - Medula oblonga sobre óbex.

3.5. Histologia

O material fixado em solução de formalina tamponada 10% foi rotineiramente processado para estudo histológico – desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes, iniciando em 70% e terminando em álcool absoluto; clareamento com xilol, impregnação com parafina fundida a 60°C (etapas realizadas em um processador histológico automático) e inclusão num molde retangular contendo parafina fundida. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

3.6. Histoquímica das lectinas

Seções do pâncreas e cerebelo foram submetidos a uma bateria com nove lectinas de diferentes especificidades, estabelecendo padrão de comparação entre animais controles e intoxicados (Tabela 5). As seções, depois de desparafinadas e hidratadas, foram incubadas em peróxido de hidrogênio 0,3% e metanólico durante 30 minutos em temperatura ambiente. Lavadas várias vezes em tampão fosfato 0,01 M (PBS), pH 7.2 e tratadas com soro-albumina bovina 0,1 em PBS, por 15 minutos. Posteriormente, foram incubadas com lectinas biotiniladas por uma hora, seguida por incubação com complexo peroxidase-avidina-biotina (ABC) por 45 minutos. A peroxidase foi marcada por incubação de quatro a dez minutos com solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo diaminobenzidina (DAB) 0,02% e H₂O₂ 0,05%. Todas as seções foram contracoradas com hematoxilina de Mayer.

Tabela 5. Lectinas utilizadas para diagnóstico de intoxicação por *Sida carpinifolia*.

Lectina	Abreviação	Especificidade Carbohidrato ^a
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Com A	α -D-Man; α -D-Glc
<i>Glycine max</i>	SBA	α -D-GalNAc; β -D-GalNAc; α e β -Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNAc
<i>Ulex europaeus-1</i>	UEA-1	α -L-Fuc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNAc, NeuNAc
<i>Succinyl-WGA</i>	sWGA	(β -(1-4)-D-GlcNAc) ²
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	B-D-Gal(1-3)GalNAc
<i>Ricinus communis-1</i>	RCA-1	B-D-Gal > α -D-Gal
<i>Bandeirea simplicifolia</i>	BS-1	α -D-Gal

^a Goldstein & Hayes (1978). Fuc = Fucose; Gal = Galactose; GalNAc= N-acetyl-galactosamine; Glc = Glicose; GlcNAc = N-acetil-glicosamina; Man = Manose; NeuNAc = ácido N-acetil-neuramínico.

Cada lectina foi utilizada em diluição de 30 mg/ml em PBS, exceto a PNA, que foi aplicada a uma concentração de 10 mg/ml. Como controle para histoquímica, a lectina foi omitida ou bloqueada em incubação com seus açúcares bloqueadores (0,1-0,2 em PBS) por uma hora em temperatura ambiente (GOLDSTEIN & HAYES, 1978).

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos de cerebelo, pâncreas, fígado, linfonodo mesentérico, tireóide e medula cervical foram coletados para microscopia eletrônica, fixados em solução de glutaraldeído a 2 % tamponado em cacodilato de sódio, refixados em tetróxido de ósmio a 1 % e desidratados em soluções crescentes de etanol e incluídos em Epon. Os cortes semi-finos foram corados pelo azul de metileno e os ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

4. RESULTADOS

4.1. Consumo de *Sida carpinifolia* secada à sombra e triturada

Os aspectos gerais do experimento, quanto aos dias de consumo, às oscilações dos pesos dos animais, à quantia consumida, e ao período de consumo da planta estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Aspectos gerais do experimento.

Animal	Diferença de Peso _§	Consumo/kg/dia (gramas)	Consumo diário Médio (gramas)	Período de consumo (dias)
1	-1	13,98	209,71	18
2	+ 2,2	30,31	545,65	30
3	-1,3	20,56	356,68	45
4	0	19,70	374,32	53
5	-1	20,10	361,81	75
6	-0,8	20,30	408,95	80
7	-27	11,19	802,23	100

§ Do início do experimento até a eutanásia.

4.2. Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos foram similares e consistiram de ataxia com hipermetria e dismetria, tremores de cabeça e pescoço, teste HR positivo a partir do vigésimo dia do experimento, quedas freqüentes e posturas atípicas: escorando-se em objetos com membros cruzados ou sentando-se com os membros posteriores voltados para trás. Todos apresentaram lentidão de movimentos e perda progressiva de peso. Os ovinos mantinham o apetite, mas tinham dificuldades para apreender, mastigar e deglutir alimentos. Os sinais clínicos exacerbavam-se quando submetidos ao exercício. Esses sinais serão descritos a seguir:

4.2.1. Ovino 1: uma fêmea, sem raça definida, com seis meses de idade, que iniciou o experimento com 16 kg de peso. Este animal consumiu *S. carpinifolia* por apenas 18 dias, quando morreu, sem apresentar qualquer sinal, a não ser emaciação (perdeu 1 kg no período). Não foram observadas alterações após teste HR.

4.2.2. Ovino 2: uma fêmea, sem raça definida, com seis meses de idade, iniciou o experimento com 17 kg de peso. Ela consumiu a planta por 30 dias

quando foi eutanasiada, apresentando sempre apetite voraz. Nos dias 17 e 18 do experimento apresentou fezes levemente amolecidas. No dia 23 apresentou diarreia aquosa e as fezes voltaram ao normal em dois dias. Do vigésimo dia em diante apresentou alterações posturais e tremores, após realizado o teste HR, que consistiam em: tremor, queda, decúbito lateral, movimentos de pedalagem e dificuldade de ficar em estação. Após alguns minutos e já de pé, mantinha o olhar atônito. Após o dia 23 apresentava tremor intencional e dificuldade em comer e beber, apresentando dificuldade em perceber distâncias visuais (para objetos próximos).

4.2.3. Ovino 3: este animal era uma fêmea, sem raça definida, de aproximadamente seis meses, e iniciou o experimento com 18 kg. Foi eutanasiada após 45 dias de experimento. Durante o período, mostrou sinais clínicos discretos, que consistiam em tremor intencional discreto e olhar atônito. Ao teste HR, mostrou sinais inconclusivos. Consumiu a planta sem dificuldade, porém, selecionava alfafa e ração.

4.2.4. Ovino 4: este animal era um macho, castrado, sem raça definida, com oito meses de idade. No início do experimento consumia a planta com certa relutância, selecionando a alfafa e a ração. Pesou 21 kg no início do experimento, porém, quando morreu, tinha 19 kg. Apresentou diarreia pastosa auto-limitante, nos dias 23 e 24. Após o dia 23, apresentou letargia, tremores da cabeça e pescoço que aumentaram progressivamente até o final do experimento. Morreu aos 53 dias do experimento, após anorexia de 24 horas, apatia, decúbito e tremores na cabeça e pescoço.

4.2.5. Ovino 5: este animal era uma fêmea, sem raça definida, com 12 meses de idade. Iniciou o experimento com 19 kg e foi eutanasiada após 75 dias. Manteve apetite durante todo o período, consumindo a planta com avidez. Após o dia 25, apresentou sinais clínicos neurológicos progressivos, que consistiam em: hiperestesia, tremor, quedas constantes, olhar atônito e teste HR positivo. Após duas semanas, apresentava tremor intencional e dificuldade em comer e beber água, evidenciando dificuldade em perceber distâncias visuais.

4.2.6. Ovino 6: macho castrado, sem raça definida e com 12 meses de idade. Este animal consumiu a planta, com voracidade, durante experimento. Após o 80º dia do experimento foi suspensa a administração de *S. carpinifolia* por um período de 70 dias. A eutanásia foi realizada aos 150 dias após o início do experimento. Do dia 23 ao 25 o animal apresentou diarreia auto-limitante discreta. O mesmo foi

observado dos dias 54 ao 58 e dos dias 74 ao 79. A partir do dia 24, foram observados os primeiros sinais clínicos neurológicos (tremor intencional e hiperestesia), que foram aumentando em intensidade progressivamente com o passar dos dias, evoluindo para olhar atônito, teste HR com respostas progressivamente mais severas, quedas constantes, dificuldade de apreender os alimentos, emaciação, apatia, lã eriçada, seca, quebradiça, que se desprendia com facilidade. Quando a *S. carpinifolia* foi suprimida da dieta, esses sinais não desapareceram, porém, foram se mostrando gradativamente em menor intensidade, notadamente a partir do décimo primeiro dia. Iniciou o experimento com 21 kg e morreu com 20,5 kg.

4.2.7. Ovino 7: texel, macho, inteiro e com dois anos de idade. Este carneiro iniciou o experimento com 85 kg, apresentava libido e apetite voraz. Iniciou o experimento comendo a planta com avidez. No dia 5, apresentou fezes amolecidas, que voltaram ao normal em 24 horas. Os primeiros sinais clínicos neurológicos foram observados após 43 dias de consumo da planta, quando se mostrou apático, inapetente, com dificuldade para se levantar e ficar em estação. No dia 49 apresentou tremor intencional, dificuldade para apreender e mastigar os alimentos (pressionava a cabeça no fundo do cocho para comer). Do dia 60 até o dia 69, o animal reduziu bastante o consumo da planta, apresentou apatia, tremores, teste HR positivo com queda posterior, pedalagem e dificuldade de levantar. A partir de então, os sinais clínicos neurológicos foram se mostrando, progressivamente, mais intensos. O consumo diário de *S. carpinifolia* manteve-se estável, em cerca de 1 kg ao dia. A partir do 80º dia, o animal ficava a maior parte do tempo deitado, em decúbito esternal, vindo a desenvolver escara de decúbito na região esternal. Foi eutanasiado aos 100 dias, pesando 58 kg.

4.3. Achados de necropsia

Durante as necropsias dos ovinos, foi observado, apenas, o aumento de volume de linfonodos, principalmente dos mesentéricos (exceto dos ovinos 1 e 7). Nos demais órgãos, não foram notadas alterações significativas.

4.4. Achados histológicos e ultra-estruturais

Microscopicamente (nos ovinos 2, 3, 4 e 5), os achados mais significativos foram observados no sistema nervoso central e caracterizaram-se por distensão e

vacuolização citoplasmática múltipla e acentuada, mais evidentes nas células de Purkinje do cerebelo (Figuras 10 e 11), nos neurônios do córtex cerebral, do tálamo, do mesencéfalo e do corno ventral da medula espinhal. Esferóides axonais foram freqüentemente encontrados na camada granular do cerebelo e, com menor intensidade, em outras áreas do encéfalo e medula espinhal. Em alguns neurônios, principalmente os de Purkinje, além da marcada vacuolização, o citoplasma remanescente apresentava-se eosinofílico, com aspecto enrugado e ocupava a periferia da célula.

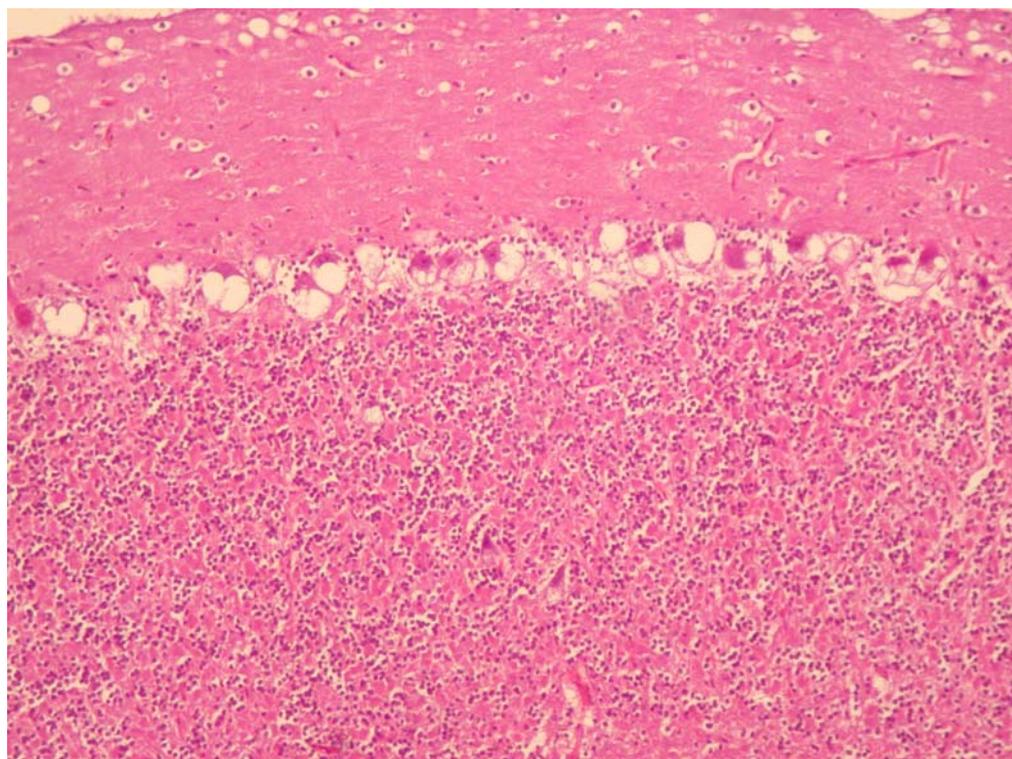


Figura 10. Cerebelo, ovino 4: vacuolização das células de Purkinje (Obj. 10, HE).

O ovino 1 apresentou vacuolização nos neurônios do corno ventral da medula espinhal, na região cervical (Figura 12). O ovino 6 não apresentou lesões histológicas significativas, limitando-se a alguns esferóides axonais na camada granular do cerebelo e com as células de Purkinje do cerebelo apresentando discreta vacuolização do citoplasma

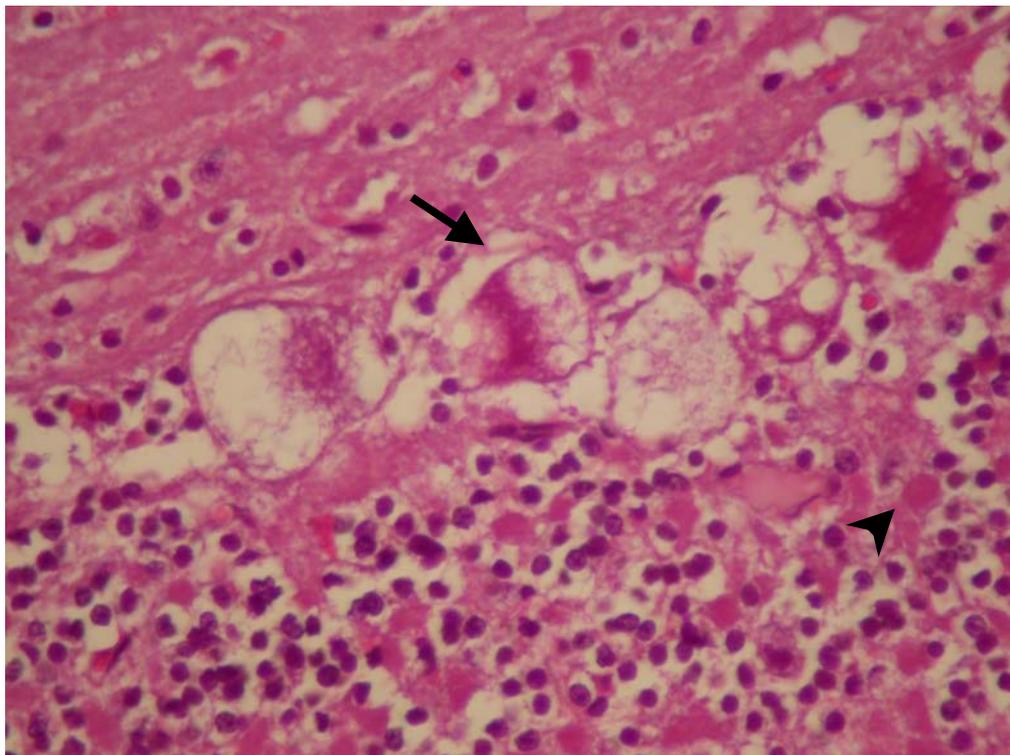


Figura 11. Ovino 4, cerebelo: camada de Purkinje, acentuada vacuolização das células de Purkinje, com citoplasma granular (seta). Esferóide axonal (cabeça de seta) (Obj. 40, HE).

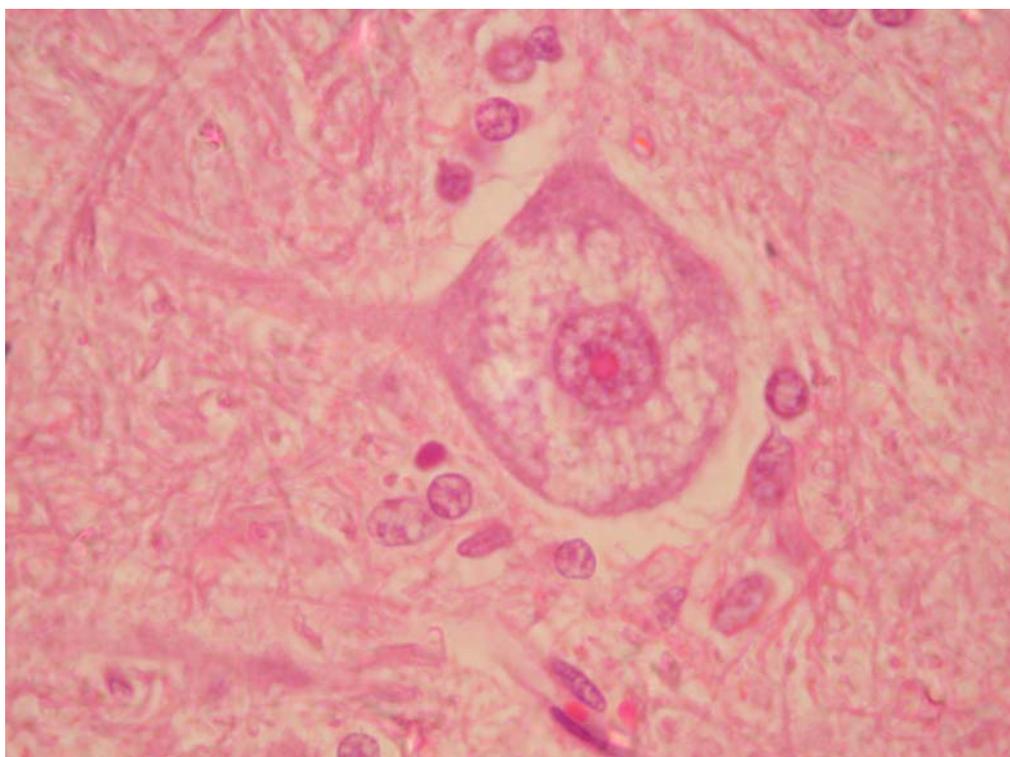


Figura 12. Ovino 1, medula espinhal cervical: vacuolização de neurônio do corno ventral. (Obj. 100, HE).

Os ovinos 4, 5 e 7 apresentaram múltiplas vacuolizações nos neurônios do córtex cerebral (Figura 13), na seção 1.

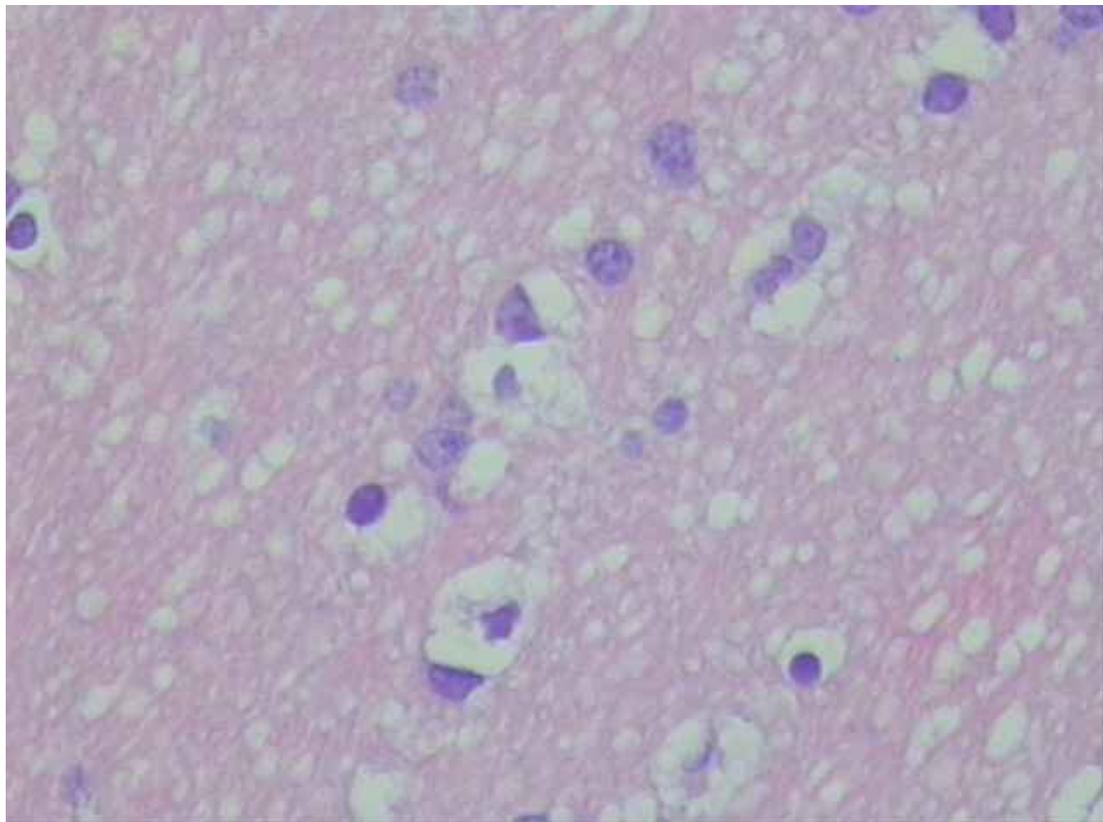


Figura 13. Ovino 5, seção 1, córtex cerebral: vacuolização neuronal (Obj. 40, HE).

Os ovinos 3, 4, 5 e 7 apresentaram vacuolização citoplasmática também no epitélio dos ácinos pancreáticos, dos túbulos renais, nas células foliculares da tireóide (Figura 14), nos hepatócitos e macrófagos de órgãos linfóides.

O ovino 7 apresentou as lesões mais intensas, com extensas áreas de degeneração dos túbulos renais, com intensa vacuolização citoplasmática (Figura 15).

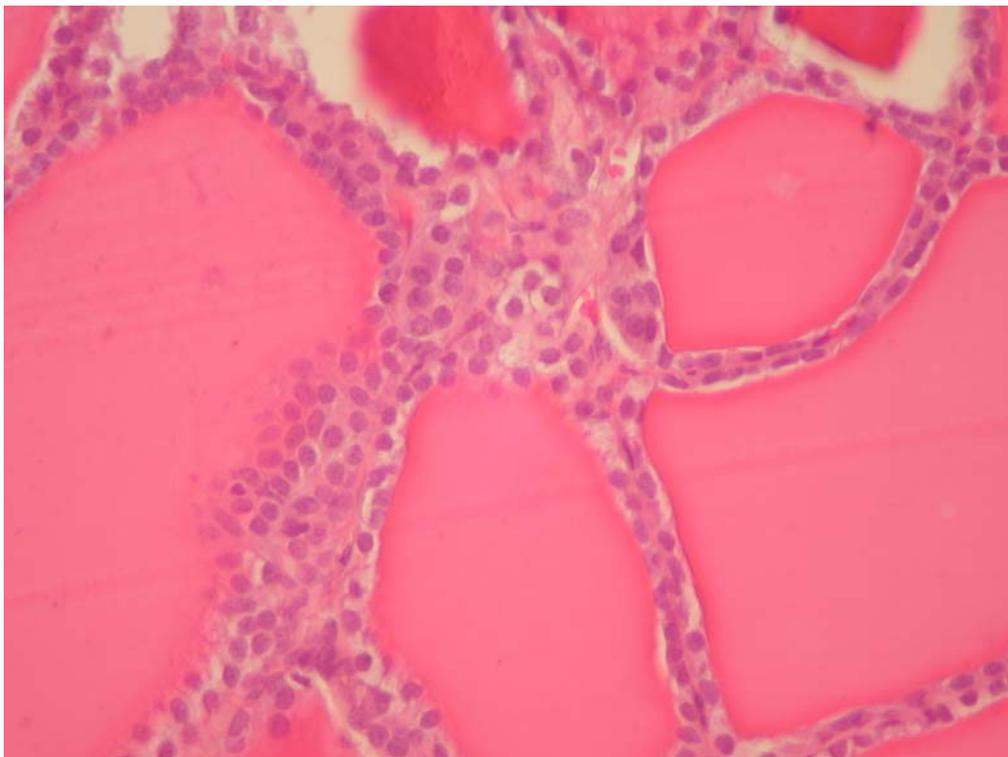


Figura 14. Ovino 4, tireóide: vacuolização das células foliculares, colóide com aspecto normal (Obj. 40, HE).

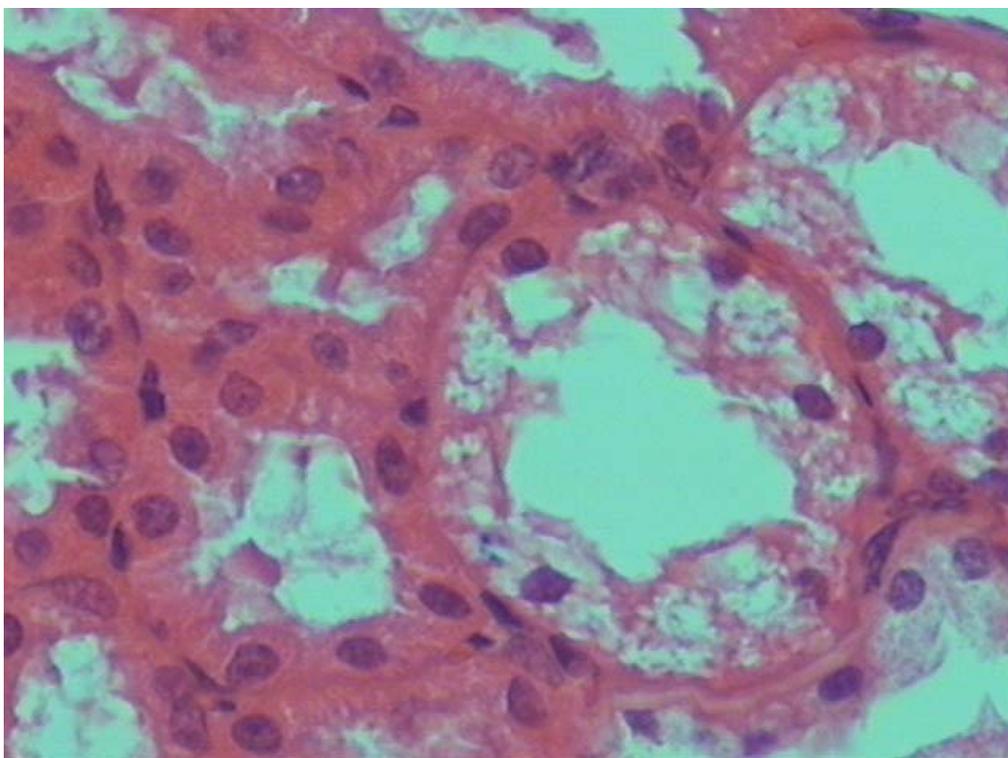


Figura 15. Ovino 7, rim: acentuada vacuolização das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (Obj. 40, HE).

O ovino 7 apresentou degeneração das células germinativas do parênquima testicular, com ausência de espermatozoides (Figura 16).

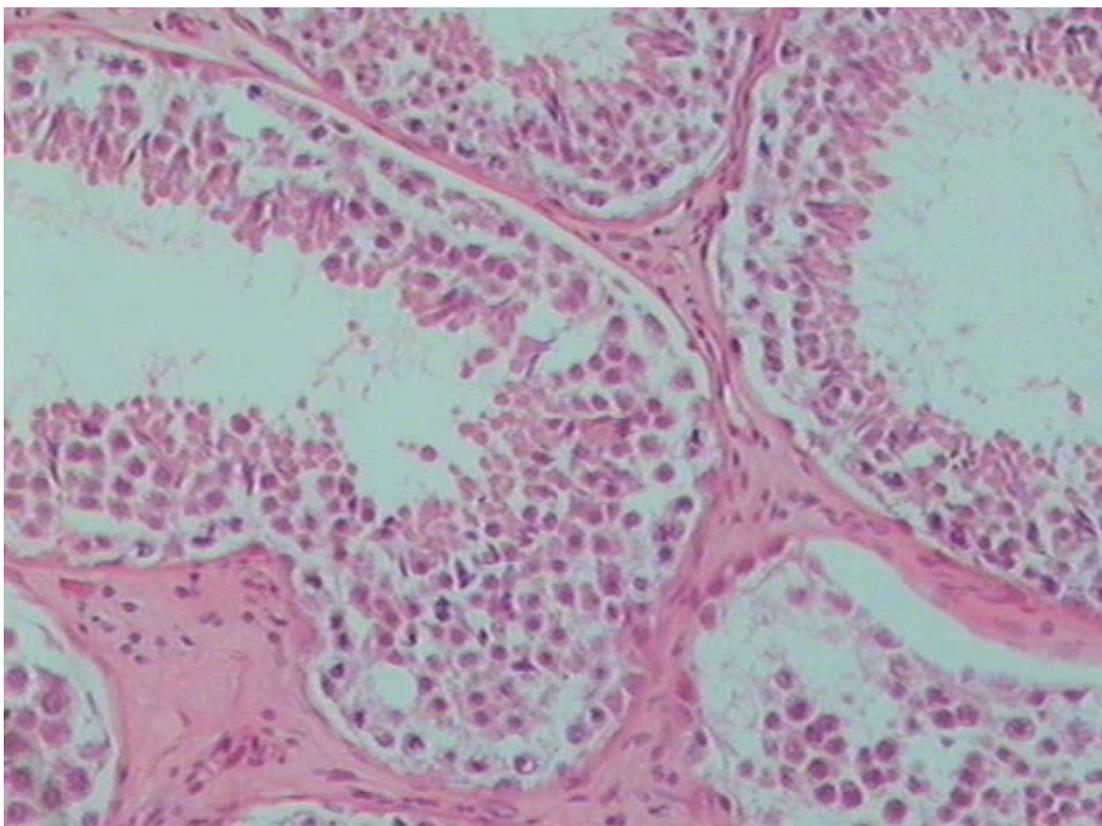


Figura 16. Ovino 7, testículo: degeneração das células germinativas do epitélio testicular com ausência de espermatozoides (Obj. 10, HE).

As lesões ultra-estruturais observadas foram vacuolizações citoplasmáticas, algumas envoltas por membranas em neurônios de Purkinje do cerebelo, e nas células foliculares da tireóide (Figura 17). O ovino 6, que permaneceu 70 dias sem consumir *Sida carpinifolia*, não apresentou alterações significativas, apenas dilatação do retículo endoplasmático rugoso das células de Purkinje do cerebelo.

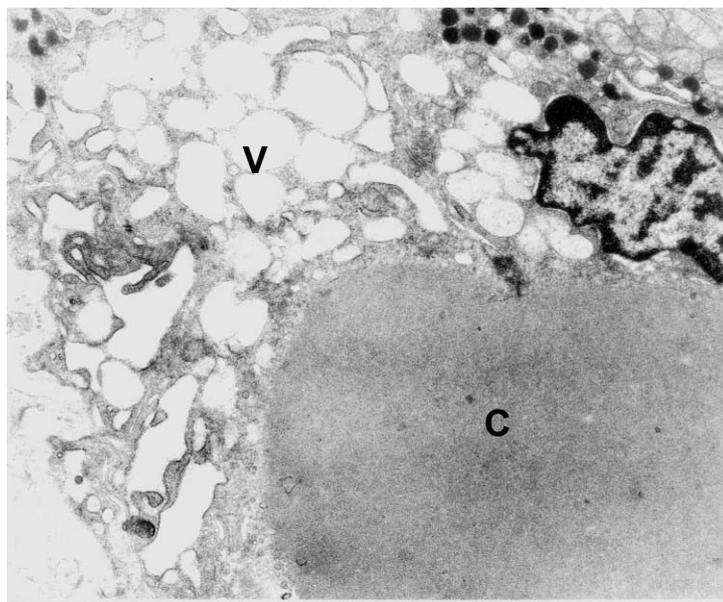


Figura 17. Ovino 7, tireóide: presença de vacuolização das células foliculares (V) apresentando colóide com aspecto normal (C) (ME, 10.500 x).

4.5. Histoquímica das lectinas

Na histoquímica das lectinas, as células de Purkinje, os neurônios da camada granular do cerebello (Figura 18), núcleos cerebelares (Figura 19) e células acinares do pâncreas reagiram fortemente com a *Concanavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* e *Triticum vulgare succinilado*, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Intensidade de coloração das lectinas em ovinos controles e intoxicados por *Sida carpinifolia*.

	LECTINAS								
	s-WGA ¹	WGA ²	UEA-I ³	PNA ⁴	RCA-I ⁵	SBA ⁶	DBA ⁷	Con A ⁸	BS-I ⁹
<u>Cerebelo</u>									
Células de Purkinje	3 (0) [†]	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
Neurônios da Camada Granular	3 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	0 (0)
Núcleos Cerebelares	3 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2-3 (0)	0 (0)
Células da Glia	3 (0)	3 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0)	0 (0)
<u>Pâncreas</u>									
Células acinares	3 (0)	2 (2)	0-2 (0-2)	0-2 (0-2)	1-2 (2)	0-1 (0-1)	0-2 (0)	3 (0-1)	0 (0)

1 = *Succinyl-WGA*; 2 = *Triticum vulgare*; 3 = *Ulex europaeus-I*; 4 = *Arachis hypogaea*; 5 = *Ricinus communis-1*; 6 = *Glycine max*; 7 = *Dolichos biflorus*; 8 = *Concanavalia ensiformis*; 9 = *Bandeirea simplicifolia*.

*Resultados de controle, para ovinos saudáveis, estão dispostos entre parênteses.

[†]Os números indicam a intensidade da coloração em uma escala subjetiva estimada entre 0, não reativa até 3, mais reativa.

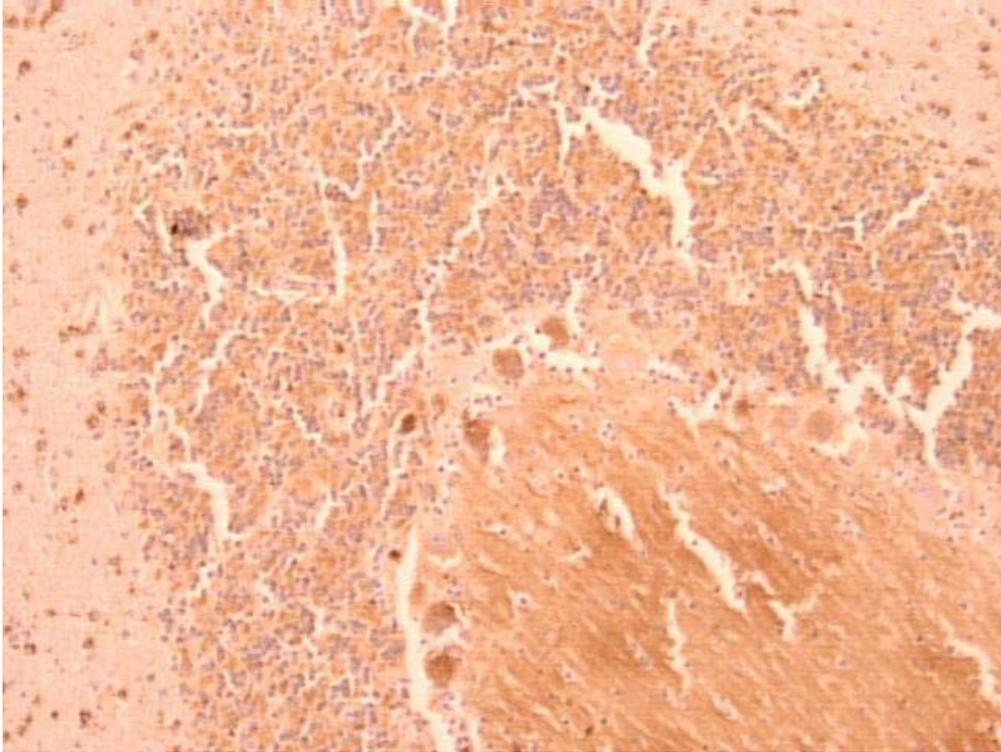


Figura 18. Ovino 5, cerebello: histoquímica das lectinas, forte marcação das células de Purkinje com SWGA (Obj. 10).

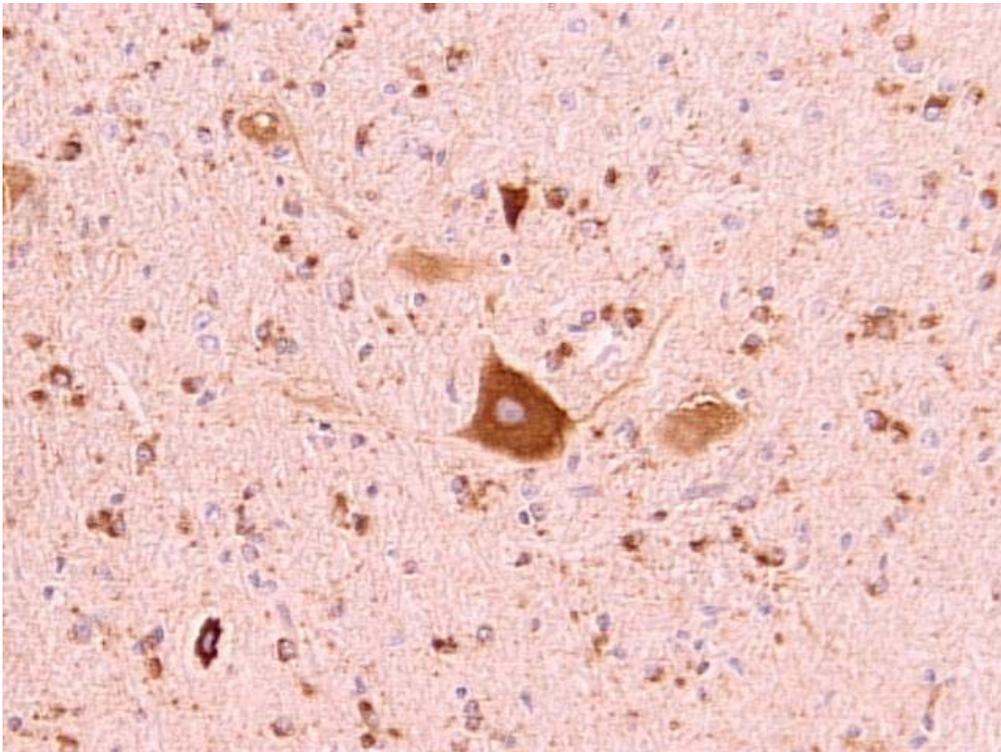


Figura 19. Ovino 5, cerebello: histoquímica das lectinas, forte marcação de neurônios dos núcleos cerebelares com SWGA (Obj. 40).

4.6. Análise bromatológica, na matéria seca, de *Sida carpinifolia* secada à sombra e moída.

Amostra de *S. carpinifolia* secada à sombra foi submetida à análise de matéria seca (Tabela 8). O material foi remetido ao laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Agronomia – UFRGS.

Tabela 8. Análise da matéria seca, de *Sida carpinifolia* secada à sombra e moída.

Análise Bromatológica <i>Sida carpinifolia</i>		
	Matéria Seca (%)	Secado ao ar (%)
Matéria Seca	100,00	83,15
Umidade		16,85

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho comprovou que a ingestão de *Sida carpinifolia* por ovinos induz à doença de armazenamento lisossomal. Através da histoquímica das lectinas, essa patologia foi classificada como α -manosidose, uma vez que o padrão obtido foi semelhante ao observado em caprinos, em casos naturais e experimentais (DRIEMEIER et al., 2000). *Sida carpinifolia* é atualmente a única espécie da família Malvaceae associada com doença de armazenamento lisossomal (COLODEL et al., 2002b).

O alcalóide indolizidina 1,2,8-triol (swainsonina), isolado de amostras de *Sida carpinifolia* (COLODEL et al., 2002b), é descrito como inibidor da atividade das enzimas α -manosidase e α -manosidase II do aparelho de Golgi (DORLING et al., 1980). O decréscimo da atividade da α -manosidase resulta no acúmulo lisossomal de oligossacarídeos incompletamente processados (STEGELMEIER et al., 1995, TULSIANI et al., 1982). A α -manosidase II do aparelho de Golgi está envolvida no processamento de oligossacarídeos durante a glicosilação de proteínas, de forma que sua deficiência causa o acúmulo de oligossacarídeos contendo manose nos lisossomos. Os resíduos armazenados não têm sido considerados diretamente tóxicos para a célula. Os sinais clínicos e lesões descritos nesta doença estariam associados aos efeitos mecânicos do armazenamento de oligossacarídeos e ao impedimento do transporte citoplasmático (AGAMANOLIS, 1995).

Os achados clínicos e patológicos da intoxicação por *S. carpinifolia* em ovinos observados neste estudo foram semelhantes aos descritos em casos de consumo de plantas dos gêneros *Swainsona* sp., *Oxytropis* sp., *Astragalus* sp. e *Ipomoea* sp. (TOKARNIA et al., 1960; KINGSBURY, 1964; DORLING et al., 1980; BALOGH et al., 1999; ARMIÉN, 2000; TOKARNIA et al., 2000).

Observou-se que o ovino 5 consumiu *Sida carpinifolia* por 75 dias e apresentou lesões histológicas características da intoxicação. Por outro lado, o ovino 6 que consumiu a planta por 80 dias e foi eutanasiado após 70 dias com dieta normal (sem *S. carpinifolia*), não apresentou estas alterações, o que indica uma provável regressão

das lesões histológicas e ultra-estruturais.

Não foram observadas alterações histológicas nos gânglios do sistema nervoso autônomo (trigêmeo, celíaco) assim como no nervo ciático. Em eqüinos, a vacuolização do gânglio celíaco pode estar associada com cólica (LORETTI et al., 2003).

Nas intoxicações por *Astragalus* sp., os animais que apresentam sinais clínicos leves e param de consumir plantas com este princípio tóxico podem recuperar-se espontaneamente (DANIEL et al., 1984; STEGELMEIER et al., 1995).

Ovinos que consumiram a leguminosa *Oxytropis sericea* em experimento, obtiveram, inicialmente, um maior ganho de peso que os animais controle (STEGELMEIER et al., 1999). Este fato não foi observado no presente trabalho, talvez pelo fato de a *S. carpinifolia* possuir pouco valor nutricional.

Foi observada grande variação individual dos animais em relação ao consumo de *Sida carpinifolia*. O ovino 6, durante a fase inicial do experimento, consumiu a planta com voracidade enquanto que os demais demoraram a se adaptar à nova dieta, buscando selecionar apenas feno de alfafa e ração comercial. Esse fato foi também observado em surtos naturais de caprinos que buscavam pastorear *S. carpinifolia*, mesmo com outros alimentos à disposição (COLODEL et al., 2002a).

Foram observadas lesões histológicas no ovino 1, que consumiu *S. carpinifolia* durante 18 dias, mesmo sem o animal apresentar sinais clínicos. A presença das alterações histológicas sem sinais clínicos também foi observada em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000a).

Através da histoquímica das lectinas é possível diagnosticar a α -manosidose induzida por *Sida carpinifolia*. O padrão obtido neste estudo é similar ao encontrado em ovinos naturalmente intoxicados (SEITZ et al., 2002) e em caprinos natural e experimentalmente intoxicados por *S. carpinifolia* (COLODEL et al., 2002a; COLODEL et al., 2002b).

As células foliculares da tireóide apresentaram vacuolização em todos os animais em graus variados exceto o ovino 6 no qual foi interrompido o fornecimento

da planta. Alterações nestas células foram observadas também por outros autores em intoxicações por “locoweeds” e *Ipomoea* sp. (MÉNDEZ & RIET-CORREA, 2000; BALOGH et al., 1999; ARMIÉN, 2000; JAMES et al., 1981) inclusive em fetos cujas mães foram intoxicadas (HARTLEY & JAMES, 1973; JAMES, 1971; HARTLEY & JAMES, 1975). Aparentemente, estas alterações degenerativas não causam disfunções funcionais na glândula, que apresenta inalterado o aspecto geral do colóide. Alterações semelhantes foram observadas também no pâncreas.

Foi observada degeneração das células germinativas do parênquima testicular associada com ausência de espermatozóides nos túbulos seminíferos bem como no epidídimo. Ao contrário do descrito por PANTER et al. (1989), não foram observadas vacuolizações nas células destes órgãos. Essas alterações degenerativas podem ter sido inespecíficas ou associadas com a doença.

As alterações de equilíbrio, associadas com ataxia e dismetria, são características de lesões cerebelares e puderam ser comprovadas também pelo teste HR. Essas lesões consistiram histologicamente de vacuolização das células de Purkinje e esferóides axonais na camada granular do cerebelo. Provavelmente, as alterações tornam-se mais evidentes nas células de Purkinje devido ao tamanho maior do seu citoplasma em relação aos demais neurônios, assim como os neurônios do corno ventral da medula espinhal. Essas alterações são comuns em α -manosidoses induzidas.

6. CONCLUSÕES

1. A *Sida carpinifolia*, secada à sombra, não perde sua toxicidade.
2. A planta *Sida carpinifolia*, secada à sombra e triturada, é tóxica para ovinos na quantidade mínima de 11 g/kg ao dia por 18 dias.
3. Baseado nos valores percentuais da matéria seca da *Sida carpinifolia*, conclui-se que o animal deve consumir cerca de três vezes mais da planta fresca, em relação à planta secada à sombra, para apresentar os sinais de intoxicação. O valor obtido pela fração do percentual de matéria seca da planta seca – 83,15; pelo percentual da matéria seca da planta verde – 27,4.
4. As principais manifestações clínicas de ovinos intoxicados por *Sida carpinifolia* são relacionadas com distúrbios neurológicos.
5. A histoquímica das lectinas é uma ferramenta confiável para diagnóstico de α -manosidose induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* na espécie ovina.
6. Ovinos podem adquirir o hábito de consumir a *Sida carpinifolia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARMIÉN, A. G., Vergleichende klinische und morphologische Untersuchungen zur spontanen und experimentellen Vergiftung durch *Ipomea fistulosa* (Convolvulaceae) bei Ziegen. Giessen. Tese de Doutorado. Justus-Liebig-Universität Giessen. Alemanha, 212 p, 2000.

BACCHI, O., LEITÃO FILHO, H. F., ARANHA, C. **Plantas invasoras de culturas**. Campinas: Circulo do Livro. v. 1, 291 p. 1982

BALOGH K. K., DIMANDE, A. P., VAN DER LUGT, J. J., MOLYNEUX, R. J., NAUDÉ, T. W., WELMAN, W. G.. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, p. 266-273, 1999.

BEAVER, B. V., 2000 – Report of the AVMA Panel on Euthanasia. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 218, n. 5, Mar 2001.

BOOTH, N. H., MCDONALD, L. E., **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, cap. 65, p. 928-932. 1992.

CARLTON, W. W., MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed, 672p., 1998.

COLODEL, E. M., DRIEMEIER, D., LORETTI, A. P., GIMENO, E. J., TRAVERSO, S. D., SEITZ, A. L., ZLOTOWSKI, P. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22, n.2, Rio de Janeiro. Abr/Jun, 2002a.

COLODEL, E. M., GARDNER, D., ZLOTOWSKI, P., DRIEMEIER, D. Identification of swainsonina as a glycosyltransferase inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 177-178., June, 2002b.

DANIEL, P. F., WARREN, C. D., JAMES, L. F. Swainsonine-induced oligosaccharide excretion in sheep. **Biochemical Journal**. Great Britain, v. 221, p. 601-607, 1984.

DORLING, P. R., HUXTABLE, C. R., COLEGATE, S. M. Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. **Biochemical Journal** v.191, n.2, p. 649-651. Nov, 1980.

DRIEMEIER, D., COLODEL, E. M., GIMENO, E. J., BARROS, S. S., Lysosomal storage disease associated with *Sida sp.* poisoning in goats. Meeting of the European

Society of Veterinary Pathology, 16th, Lillehammer, Noruega, **Anais**, p. 140. Sept, 1998a.

DRIEMEIER, D., LORETTI, A. P., COLODEL, E. M. Intoxicación espontánea por *Sida carpinifolia* (malvaceae) ponies el sur de Brasil In: Reunión Argentina de patologia veterinaria, 1., 1998, **Anais**. Provincia de Santa Fé, 1998b.

DRIEMEIER, D., COLODEL, E. M., GIMENO, E. J., BARROS, S. S. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. **Veterinary Pathology**. v. 37, n.2., p. 153-159., Mar, 2000.

GIMENO, E. J., COLODEL, E. M., LORETTI, A. P., DRIEMEIER, D. Lectin histochemistry pattern of an equine lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning. **Anais** Proceedings 19^a Meeting ESVP, Tessalonica-Grécia, p.222, Set, 2001.

GOLDSTEIN, I. J., HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. **Chemistry Biochemistry** v. 35, p. 127-340, 1978.

GUTERRES, S., DALLA COSTA, T. C. T., HENRIQUES, A. T. Análise fitoquímica preliminar e atividade antiinflamatória das folhas e raízes de *Sida carpinifolia* (L.f.) K. Schum. (Guanxuma Preta) In: Semana acadêmica de estudos farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 13., 1987, Porto Alegre. **Resumos**. 1987.

HARPER, H. A., RODWELL, V. W., MAYES, P. A., **Manual de química fisiológica**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, São Paulo, 736 p., 1982

HARRIS, C. M., CAMPBELL, B. C., MOLLYNEUX R. J., HARRIS, T. M. Biosynthesis of swainsonine in the diablo locoweed (*Astragalus oxyphysus*). **Tetrahedron Letters**, v. 29, n. 38, p. 4815-4818, Great Britain, 1988.

HARTLEY, W. J., JAMES, L. F. Microscopic lesions in fetuses of ewes ingesting locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **American Journal Veterinary Research**. v. 34, n. 2, p. 209-211, Feb, 1973.

HARTLEY, W. J., JAMES, L. F. Fetal and maternal lesions in pregnant ewes ingesting locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **American Journal Veterinary Research**, v. 36, n. 6, p. 825-826, June, 1975.

HENRIQUES, A. T., SIQUEIRA, N., SCHAPOVAL, E. E. S., GUTERRES, S., DALLA COSTA, T. C. T. Análise farmacognóstica preliminar e atividade antiinflamatória das folhas de *Sida carpinifolia* (L.f.) K. Schum., Malvaceae (Parte I). **Revista Brasileira de Farmácia**. São Paulo, v. 70, n.3, p.55-58, 1989.

HUXTABLE, C. R. Experimental reproduction and histopathology of *Swainsona galegifolia* poisoning in the guinea pig. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**. v. 47, n. 3, p. 339-347, 1969.

HUXTABLE, C. R., DORLING, P. R. Animal model of human disease.

Mannosidosis. Swainsonine-induced mannosidosis. **American Journal of Pathology**. United States. v. 107, No. 1, pags. 124-126. Apr, 1982.

JAMES, L. F., SHUPE, J. L., BINNS, W., KEELER, R. F., Abortive and teratogenic effects of locoweed on sheep and cattle. **American Journal Veterinary Research**. v. 28, n. 126, p. 1379-1388, Sept, 1967.

JAMES, L. F., KEELER, R. F., BINNS W. Sequence in the abortive and teratogenic effects of locoweed fed to sheep. **American Journal Veterinary Research**. v. 30, p. 377-380, March, 1969.

JAMES, L. F. Lesions in neonatal lambs resulting from maternal ingestion of locoweed. **Cornell Vet**. v. 61, n. 4, p. 667-670, 1971.

JAMES, F. L. Effect of locoweed on fetal development: preliminary study in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 835-840, April, 1972.

JAMES, L. F., HARTLEY W. J., VAN-KAMPEN, K. R. Syndromes of astragalus poisoning in livestock. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.178, n. 2, p.146-150, Jan 15, 1981.

JAMES, L. F.; HARTLEY, W. J.; NIELSEN, D.; ALLEN, S.; PANTER, K. E. Locoweed (*Oxytropis sericea*) poisoning and congestive heart failure in cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 189, n. 12, p. 1549-1556, Dec, 1986.

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

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 427 p. 1999.

KHOLKUTE, S. D., MUNSHI, S. R., NAIK, S. D., JATHAR, V. S., Antifertility activity of indigenous plants *Sida carpinifolia* Linn & *Podocarpus brevifolius* stapf in female rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 16, n. 6, p. 696-698, Jun, 1978.

KING, N. W., ALROY, J. Deposições intracelulares e extracelulares; degenerações. In: JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, cap. 2, p. 27-59. 2000.

KINGSBURY, J. M. **Poisonous Plants of the United States, Canada**. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 626 p., 1964.

KIRKPATRICK, J. G., BURROWS, G. E. Locoism in horses. (Toxic Plant Case Reports). **Veterinary and Human Toxicology**. v. 32, n. 2, p. 168-169, April, 1990.

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

KNIGHT, A. P.; WALTER, R. G. Plants affecting the digestive system In: KNIGHT, A. P.; WALTER, R. G. **A guide to plant poisoning of animals in North America**. Publisher: Teton, NewMedia, Ithaca, New York, USA. p. 367, Feb/2003

LAWS, L., ANSON, R. B. Neuronopathy in sheep fed *Swainsona luteola* and *S. galegifolia*. **Australian Veterinary Journal**, v. 44, oct, 1968.

LORENZI, H. **Manual de identificação e de controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum Ltda, 339 p., 2000a.

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

LORENZI, H, MATOS, F. J. A., **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum Ltda, 2002, 512 p.

LORETTI, A. P., COLODEL, E. M., DRIEMEIER, D., CORBELLINI, L. G. Intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em pôneis na região sul do Brasil In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1999, Belo Horizonte - MG. **Resumos**. Belo Horizonte - MG: FEP – MVZ, p.112, 1999.

LORETTI, A. P., COLODEL, E. M., GIMENO, E. J., DRIEMEIER, D. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**, 2003 (no prelo).

MAENHOUT, T., KINT J. A., DACREMONT, G., DUCATELLE, R., LEROY, J. G., HOORENS, J.K. Mannosidosis in a litter of Persian cats. **Veterinary Record**. United States, v. 122. p. 351-354, April 9, 1988.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999. 225 p.

MÉNDEZ, M. DEL C., RIET-CORREA, F., **Plantas tóxicas e micotoxícoses**. Pelotas: Universitária, UFPel, 2000, 112 p.

MEUTEN J. D. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Iowa: Iowa state Press, 788p. 2002.

MISRA, A., MISRA, S. N. Study on the toxic effect of *Ipomea carnea* in sheep, goats and cattle. **Indian Veterinary Journal**, v. 42, n. 9, p. 703-707, 1965.

MOLYNEUX, R. J., JAMES, L. F., Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Science**, vol. 216, p. 190-1. 9 April, 1982.

MOLYNEUX, R. J., McKENZIE, R. A., O'SULLIVAN, B. M., ELBEIN A. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B₂ in weir

vine (*Ipomea* sp. Q6 [aff. Calobra]) and correlation toxicity. **Journal of Natural Products**, v. 58, n.6, p. 878-886, June, 1995.

MOREMEN, K. W. Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagines-linked oligosaccharide processing in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, p. 225-235, 2002.

OSWEILER, G. D., **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, 526 p.

PANTER, K. E., BUNCH, T. D., JAMES, L. F., SISSON, D. V. Ultrasonographic imaging to monitor fetal and placental developments in ewes fed locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **American Journal Veterinary Research**. v. 48, n. 4, p. 686-690., 1987.

PANTER, K. E., JAMES, L. F., HARTLEY, W. J. Transient testicular degeneration in rams fed locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Veterinary and Human Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 42-46, 1989.

PAULOVICH, F. B., PORTIANSKY, E. L., GIMENO, E. J., SCHILD, A. L., MÉNDEZ, M. del C., RIET-CORREA, F. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 49, p. 473-477, 2002.

PEARSON, W. H., HEMBRE, E. J., Synthesis of tetrahydroxyquinolizidines: ring-expanded analogs of the mannosidase inhibitor swainsonine. **Journal of Organic Chemistry**. United States, v. 61, n. 16, p. 5537-5545, 1996a.

PEARSON, W. H., HEMBRE, E. J. A practical synthesis of (-)-swainsonine. **Journal of Organic Chemistry**. United States, v. 61, n. 20, p. 7217-7221, 1996b.

PIENAAR, J. G.; KELLERMANN, T. S.; BASSON, P. A.; JENKINS, W. L.; VAHRMEIJER, J. Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N.E. Br. Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**. v. 43, n. 2, p. 67-74, 1976.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed., London: Saunders, 1877 p., 2000.

Resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária do Brasil – **Resolução n.º 714** que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Disponível em <<http://www.cfmv.org.br/res714.htm>> Atualizado em: 24.06.2002. Acesso em: 14 mai, 2003.

RIET-CORREA, F., SCHILD, A. L., MÉNDEZ, M. DEL C., LEMOS, R. A. A., **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. v.2. p.

SEITZ, A. L., GIMENO, E. J., TRAVERSO, S. D., SCHMITZ, M., ZLOTOWSKI, P., COLODEL, E. M., DRIEMEIER, D. Intoxicação Espontânea por *Sida*

carpinifolia (Malvaceae) em ovinos In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 29, 2002, Gramado - RS. **Resumos do XXIX CONBRAVET**. Porto Alegre, SOVERGS, v.1. 2002.

SHARMA, R. P., JAMES, L. F., MOLYNEUX, R. J. Effect of repeated locoweed feeding on peripheral lymphocytic function and plasma proteins in sheep. **American Journal Veterinary Research**. v. 45, n. 10, p. 2090-2093, Oct. 1984.

STEGELMEIER, B. L., JAMES, L. F., PANTER, K. E., MOLYNEUX, R. J. Tissue and serum swainsonine concentrations in sheep ingesting *Astragalus lentiginosus* (locoweed). **Veterinary and Human Toxicology**. v.37, n. 4, p.336-339, Aug, 1995.

STEGELMEIER, L. B., JAMES, L. F., PANTER, K. E., GARDNER, D. R., PFISTER, J. A., RALPHS, M. H., MOLYNEUX, R. J. Dose response of sheep poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, p. 448-456, 1999.

STEGELMEIER, B.L., HALL, J.O., MATTIX, M.T. Neurologic disease in range goats associated with *Oxytropis sericea* (locoweed) poisoning and water privation. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 43, n. 5, p. 302-304. Oct, 2001.

TABOSA, I. M., SOUZA, J. C. de A., GRAÇA, D. L., BARBOSA-FILHO, J. M., ALMEIDA, R. N., RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation fo the trigeminal nuclei in goats caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods (mesquite beans). **Veterinary and Human Toxicology**. v. 42, n. 3, Jun, 2000.

TOKARNIA, C. H., DOBEREINER, J., CANELLA, C. F. C. Estudo experimental sobre a toxidez do “canudo” (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes. **Arquivo do Instituto de Biologia Animal**. Rio de Janeiro, v. 3., p. 59-71, 1960.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V., **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 309 p., 2000.

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

WARREN, C. D., ALROY, J. Morphological, biochemical and molecular biology approaches for the diagnosis of lysosomal storage diseases. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 12, p. 483-496, 2000.

WINCHESTER, B. Role of α -D-mannosidases in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins. **Biochemical Society Transactions**. 5th meeting, Strathclyde, v. 12, n. 3, p. 522-524. 1984.