

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

INTOXICAÇÃO POR *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM CAPRINOS

EDSON MOLETA COLODEL

PORTO ALEGRE
2005

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

INTOXICAÇÃO POR *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM CAPRINOS

Autor: Edson Moleta Colodel

Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE
2005



FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA

APROVADO POR:

Dr. ALDO GAVA
Membro da Banca

Dr. CLAUDIO BARROS
Membro da Banca

Dra. MARIA ISABEL EDELWEISS
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

AO GABRIEL

À SAMIRA

AOS MEUS PAIS e IRMÃOS

AGRADECIMENTOS

Ao Professor, Orientador e Amigo David Driemeier pelos ensinamentos e persistência.

À Universidade Federal do Mato Grosso, pela liberação e apoio para realização do curso de Pós-Graduação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária, pela acolhida.

Ao Professor Severo Sales de Barros, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, pela realização da ultra-estrutura.

Aos Professores Eduardo Juan Gimeno, Enrique Portiansky e Cláudio Barbeito, da Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, Argentina, pelo auxílio na histoquímica com lectinas.

Ao Professor Roberto Giugliani do Serviço de Genética Médica, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela colaboração na execução deste trabalho.

A Colega Marisete Bedin pela condução, divisão de dados e a amizade durante o desenvolvimento do projeto.

À Escola Técnica de Agricultura de Viamão, por disponibilizar a área para coleta de *Sida carpinifolia*.

Aos Professores Aldo Gava, Cláudio Barros, Carlos Tokarnia e Paulo Peixoto pela contribuição para minha formação em Patologia Veterinária.

Ao amigo Anderson Seitz pelo auxílio e amizade.

À Marília T. de Oliveira Belmonte e Ângela R. Belmonte de Souza, pela amizade e apoio técnico.

Aos Colegas de Pós-Graduação André Mendes Ribeiro Corrêa, Caroline Argenta Pescador, Milene Schmitz, Priscila Zlotowski, Sandra Traverso, Daniela Bernardete Rozza, Luis Gustavo Corbellini, Cláudio Cruz, Eduardo Conceição, Edna C. Sanches e Professora Rosemari T. Oliveira pela convivência e Amizade.

Aos Estagiários e bolsistas do Setor de Patologia Veterinária, Vivian Cristina Schwantes, Paulo Mota Bandarra, Camila Spagnol, Juliano Leal, Fábio de Souza Guagnini, Mauro R. Borba, Djeison L. Raymundo e Xênia Emmel, pela amizade e auxílio na rotina deste e de outros trabalhos.

A todos que de alguma forma contribuíram para desenvolvimento deste projeto, em especial àquelas que foram nas várias “saídas” para coleta de planta.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na execução de projeto e a CAPES pela concessão da Bolsa de Capacitação.

INTOXICAÇÃO POR *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM CAPRINOS¹

Autor: Edson Moleta Colodel
Orientador: David Driemeier

RESUMO

Descrevem-se os achados clínicos e patológicos da intoxicação espontânea e experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Os achados da intoxicação espontânea serão apresentados em dois artigos. Um deles relata pela primeira vez uma doença investigada em de 1997 no município de Lajeado, RS. O outro artigo descreve os aspectos clínicos e patológicos da intoxicação espontânea em dois surtos adicionais, ocorridos no ano de 2001 no município de Glorinha e em Porto Alegre, RS. Nesses trabalhos caracterizou-se através de exames clínicos, patológicos e ultra-estruturais uma doença de depósito lisossomal. Por análise do padrão de coloração com histoquímica de lectinas, em cortes histológicos do cerebelo, pâncreas e fígado, observou-se afinidade de marcação especificamente com *Concanavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* e *T. vulgare*-succinilado, similar ao de alfa-manosidose hereditária ou adquirida por ingestão de plantas do gênero *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus* e *Ipomoea*. A caracterização do princípio tóxico da planta, associada com as lesões que induzem o quadro clínico, foi apresentada em forma de um artigo. A metodologia e resultados do estudo experimental da intoxicação por *Sida carpinifolia* serão aqui descritos. Para caracterizar o quadro clínico e patológico, foi administrada a 14 caprinos, divididos 7 grupos de dois indivíduos cada, *Sida carpinifolia*, secada a sombra e triturada por períodos de 15, 20, 40, 60, 90 e 120 dias. O consumo diário variou de 14 a 21g/kg nos diferentes grupos durante o experimento. Para outros 3 caprinos efetuou-se a administração forçada da planta seca por via oral, de 10 a 12,5 g/kg, durante 30 dias. O quadro clínico até os 30 dias de consumo da planta consistia principalmente de letargia, alteração intermitente da consistência das fezes e diminuição no ganho de peso. Por volta de 40 dias de consumo, os caprinos demonstravam também incoordenação motora aos estímulos e após os 60 dias de consumo ocorria incoordenação motora espontânea, com tremores musculares de cabeça e pescoço principalmente. As principais alterações histológicas e ultra-estruturais foram vacuolização e tumefação citoplasmática em neurônios, células da tireóide e pâncreas observadas com intensidade leve após 15 dias de consumo e acentuada após os 90 dias de consumo de *Sida carpinifolia*.

Palavras-chave: *Sida carpinifolia*, swainsonina, doença de depósito lisossomal, caprino, plantas tóxicas.

¹ Tese de doutorado em Ciências Veterinárias – Cirurgia e Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (xx p.) março de 2005.

EXPERIMENTAL POISONING BY *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) IN GOATS

Author: Edson Moleta Colodel

Adviser: David Driemeier

ABSTRACT

The clinical and pathological findings in the spontaneous and experimental *Sida carpinifolia* poisoning in goats are described. Two papers that report *Sida carpinifolia* toxicosis in goats are the basis of this work. The initial outbreak of *Sida carpinifolia* toxicosis, was investigated in 1997 and occurred in the county of Lajeado, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. Another article includes our observations on two additional outbreaks of *Sida carpinifolia* poisoning, which occurred in the counties of Glorinha and Porto Alegre in 2001. A lysosomal storage disease was characterized through clinical, pathological, and ultrastructural exams. The lectin histochemistry applied to sections of cerebellum, pancreas and liver revealed strong reactions with *Concanavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* and succinil-*T. vulgare*. This binding pattern characterizes an alpha-manosidosis similar to that observed in other plant poisonings including the genera *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus*, and *Ipomoea*. The characterization of the swainsonine alkaloid associated with the lesions that induced the clinical picture is presented in a third article. The clinical and pathological picture was reproduced by dosing goats with dry and crushed *Sida carpinifolia* leaves. Fourteen goats were distributed in seven groups of two animals, which consumed the plant during 15, 20, 40, 60, 90 and 105 days. The daily consumption varied from 14 to 21g/kg in different groups. Additional three goats were forced fed the plant at 10 to 12.5 g/kg, for 30 days. Up to the 30th day of consumption signs included mainly lethargy, intermittent alteration in the consistence of feces and lower average daily weight gains. At the 40th day, goats demonstrated incoordination to the exercise, and after the 60th day of consumption spontaneous incoordination gait and muscular tremors of the head and neck were also noticed. The main histological and ultrastructural change consisted cytoplasmic vacuolation in neurons, cells of the thyroid and pancreas. These changes were mild at 15 days of consumption and enhanced after the 90th day of *Sida carpinifolia* ingestion.

Keywords: *Sida carpinifolia*, swainsonine, lysosomal storage diseases, goats, poisonous plants.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Aspectos botânicos de <i>Sida carpinifolia</i>	3
2.2 Generalidades sobre doenças de depósito lisossomal	4
2.3 Generalidades sobre glicoproteínoses/oligosacarídeos.	6
2.4 Considerações sobre alfa-manosidose.....	8
2.5 Doenças de depósito lisossomal associadas ao consumo de plantas que contém o alcalóide swainsonina.....	10
2.6 Swainsonina: inibidor do metabolismo de glicoproteínas.....	12
2.7 Alterações clínicas e patológicas das intoxicações por plantas que contém Swainsonina.....	14
2.8 Diagnóstico de intoxicação por plantas que contém o alcalóide Swainsonina.....	17
2.8.1 Uso de lectinas para caracterização de doença de depósito lisossomal.....	17
2.9 Importância da <i>Sida carpinifolia</i> como planta tóxica de interesse pecuário	21
3- MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Coleta, classificação botânica e processamento de <i>Sida carpinifolia</i>	22
3.2 Animais experimentais	23

3.3 Exame clínico dos animais experimentais.....	25
3.5 Procedimentos para eutanásia dos animais experimentais	26
3.6 Estudo das alterações morfológicas.....	26
3.6.1 Exame macroscópico.....	26
3.6.2 Análise histológica	27
3.6.3 Histoquímica de Lectinas	27
3.6.4 Estudo ultra-estrutural	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Achados Clínicos.....	32
4.2 Achados patológicos.....	38
4.2.1 Alterações macroscópicas	38
4.2.2 Alterações histológicas.....	39
4.2.3 Histoquímica com lectinas	47
4.2.4 Achados ultra-estruturais.....	47
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Grupos de lectinas com receptiva afinidade a diferentes oligossacarídeos	20
TABELA 2. Características dos caprinos experimentalmente intoxicados por <i>Sida carpinifolia</i> . Demonstração do consumo médio e duração do período experimental com e sem consumo de <i>Sida carpinifolia</i>	31
TABELA 3. Intoxicação experimental por <i>Sida carpinifolia</i> (Malvaceae) em caprinos. Demonstração do peso médio dos Caprinos durante o período experimental com e sem consumo de <i>Sida carpinifolia</i>	33
TABELA 4. Intoxicação experimental por <i>Sida carpinifolia</i> (Malvaceae) em caprinos. Relação do início dos sinais clínicos e intensidade do quadro clínico com a evolução do experimento.	35
TABELA 5. Intensidade de lesão (vacuolização e tumefação do citoplasma) em diferentes áreas do sistema nervoso central e periférico, pâncreas e tireóide em caprinos experimentalmente intoxicados por <i>Sida carpinifolia</i>	40
TABELA 6. Intoxicação experimental por <i>Sida carpinifolia</i> em caprinos. Intensidade de marcação das lectinas de <i>Triticum vulgare</i> , de <i>Triticum vulgare succinilada</i> e de <i>Concanavalina ensiformis</i> nos diferentes grupos de neurônios do cerebelo relacionados com o período de consumo de <i>Sida carpinifolia</i>	48

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Aspectos da *Sida carpinifolia*. (a). área de pastagem invadida por *Sida carpinifolia*. (b). aspectos do arbusto. (c). detalhes das folhas alternadas e inflorescência axilar, (d). detalhes da Flor..... 23
- FIGURA 2. (a). Vista dorsal e (b) ventral do encéfalo de caprino com demarcações das áreas seccionadas para o estudo histológico das alterações causadas pela ingestão de *Sida carpinifolia* em caprinos. 29
- FIGURA 3. Áreas de secção do encéfalo para estudo das alterações histológicas associadas ao consumo de *Sida carpinifolia* em caprinos. (1). secção transversal do córtex cerebral e corpo estriado sobre o quiasma óptico, (2). secção transversal do córtex cerebral e tálamo sobre o corpo mamilar, (3). secção transversal do mesencéfalo sobre o colículo rostral, (4). secção transversal do cerebelo e medula oblonga sobre o pedúnculo cerebelar médio, (5). secção transversal da medula oblonga sobre o óbex..... 30
- FIGURA 4. Caprino após 15 dias de consumo experimental de *Sida carpinifolia*, demonstrando pelagem grosseira. Há também fezes pastosas no piso da baía..... 36
- FIGURA 5. Caprino 11 após 35 dias de consumo de *Sida carpinifolia* apresentando fraco desenvolvimento corporal, pêlos arrepiados e dismetria durante movimentação..... 37
- FIGURA 6. Caprino 11 experimentalmente intoxicado com *Sida carpinifolia*, em uma seqüência de imagens aos 90 dias de consumo. Inicialmente em decúbito lateral com dificuldade para ficar em estação demonstrando pedalagem e posteriormente com incoordenação..... 38
- FIGURA 7. Alterações histológicas discretas no sistema nervoso central de caprinos após o consumo de *Sida carpinifolia* por 15 dias. (a) A maior parte das células de Purkinje estão histologicamente normais, HE, 200x (b) por vezes elas estão finamente vacuolizadas (seta), HE,

- 200x, (c) há vacuolização de neurônios do corno ventral da medula espinhal, HE 400x, (d) e em neurônios do córtex cerebral (seta), HE. 100x. 41
- FIGURA 8. Achados histológicos em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 15 dias. Vacuolização moderada do epitélio do pâncreas (a), HE, 100x, e ductos de glândulas salivares (b), HE, 100x. No Caprino 3 havia vacuolização de macrófagos reticulares de linfonodos (c), HE, 200x, e de neurônios de plexos mioentéricos (d), HE, 400x. 42
- FIGURA 9. Alterações histológicas encontradas em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 20 e 30 dias. (a). Nota-se leve vacuolização de neurônios de Purkinje HE, 200x, e (b) HE 400x, (c). há vacuolização de neurônios do corno ventral da medula espinhal, HE, 40x, (d) HE, 400x. 43
- FIGURA 10. Achados histológicos no cerebelo de caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por mais de 90 dias. (a) difusa tumefação e vacuolização de células de Purkinje e esferóide axonal na camada granular (seta) HE, 100x, (b) ampliação da imagem anterior para observação da tumefação e vacuolização do citoplasma da célula de Purkinje, HE, 400x, (c) camada granular do cerebelo com vacuolização de neurônio de Golgi (seta), HE, 400x, (d), neurônio de núcleo cerebelar tumefeito e vacuolizado e múltiplos esferóides eosinofílicos (seta), HE, 400x, (e) vacuolização de células de Purkinje e tumefação axonal na camada granular, HE, 100x, (f) ampliação da imagem anterior, HE, 400x. 44
- FIGURA 11. Achados histológicos em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 93 dias. (a) Vacuolização moderada difusa do epitélio folicular da tireóide, Caprino 11, HE, 40x, (b) vacuolização acentuada no epitélio folicular da tireóide do Caprino 1, HE, 200x, (c). no Caprino 1 nota-se difusa e moderada do epitélio acinar do pâncreas HE, 200x, e (d) do epitélio do epidídimo, HE, 200x. 45
- FIGURA 12. Demonstração de marcação no citoplasma de neurônios do Caprino 1, que consumiu a planta por 105 dias. (a). Forte marcação citoplasmática de neurônios de Purkinje com ácido periódico de Schiff. PAS, 200x, (b). marcação do citoplasma das células de Purkinje na coloração de Zielh-Neelsen contraindicada com Hematoxilina de Mayer. ZH, 400x. 46
- FIGURA 13. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Observação microscópica da marcação de células de Purkinje, em diferentes períodos de consumo de *Sida carpinifolia*, através da histoquímica com a lectina sWGA. O pigmento marron no citoplasma das células indica a ligação desta lectina com o resíduo beta-(1-4)-D-N-acetil-glicosamina. 400x. (a). controle, (b). 15 dias, (c). 40 dias, (d). 93 dias, (e). 40 dias após o consumo durante um período de 93 dias, (f). 105 dias de consumo. 49

FIGURA 14. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Observação microscópica da marcação de neurônios do cerebelo após o consumo de *Sida carpinifolia* por 105 dias. (a). forte marcação com sWGA (*Triticum vulgare* succinilado) em neurônios de Purkinje (→), em neurônios da camada molecular “células em cesto” (círculo branco) e neurônios granulares (círculo azul), 400x, (b). neurônios de núcleo cerebelar com forte marcação pela lectina sWGA, 400x esta marcação, com a cor marron no citoplasma dos neurônios (em a e b), indica a ligação com o resíduo beta-(1-4)-D-N-acetil-glicosamina, (c). neurônios de Purkinje marcados pela lectina Con-A (*Concanavalia ensiformis*), 400x,. A marcação marron no citoplasma está associada com a ligação da Con-A com alfa-D-manose e/ou alfa-D-glicose, (d). marcação pela WGA (seta), indicando a presença de beta-D-N-acetil-glicosamina, em células de Purkinje, 400x..... 50

FIGURA 15. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Estudo ultra-estrutural. (a). cerebelo, célula de Purkinje com pericário contendo diversos vacúolos delimitados por membrana, alguns com material finamente granular, 12600x, (b). células de Purkinje com restos de membranas nos vacúolos, 21.600x, (c). pâncreas com células acinares repletas de vacúolos delimitados por membranas, em alguns há grânulos de secreção e outros corpos residuais (seta), 5400x. (d). tireóide com citoplasma de células foliculares com vacúolos e material finamente granular. Há restos celulares na luz dos folículos. 5400x. (e). Fígado, hepatócito sem alterações, há vacuolização do endotélio. 3000x. (f) pâncreas, vacuolização do epitélio acinar. A célula endócrina não tem vacúolos, há dilatação de mitocôndrias, algumas com cristas encurtadas (seta)..... 51

LISTA DE ANEXOS

ARTIGO 1.....	70
ARTIGO 2.....	78
ARTIGO 3.....	86

1. INTRODUÇÃO

A forma adquirida de alfa-mansidose que ocorre pela ingestão prolongada de plantas do gênero *Swainsona*, *Astragalus*, *Oxytropis* e *Ipomoea* (Hartley *et al.*, 1970; Dorling *et al.*, 1978; Ralphs & James, 1999; Balogh *et al.*, 1999), é bastante conhecida de grande importância na medicina veterinária. Essas plantas contêm o alcalóide indolizidínico denominado swainsonina que inibe a atividade de alfa-mansidase e mansidase II resultando em depósito lisossomal com lesões similares a alfa-mansidose congênita. Histologicamente há vacúolos citoplasmáticos em células do sistema nervoso central e em diversos outros tecidos. Os neurônios são consistentemente afetados devido ao caráter permanente desta população de células (Summers *et al.*, 1995). Animais que consomem plantas que contêm swainsonina exibem quadro clínico com alterações neurológicas caracterizadas por letargia, tremores musculares, incoordenação, ataxia e quedas, especialmente quando os animais são movimentados (James *et al.*, 1970; Huxtable & Dorling, 1982).

Este trabalho tem por objetivo a caracterização epidemiológica, clínica e patológica da intoxicação natural e experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Adicionalmente busca-se com base nos dados obtidos, sugerir medidas de controle da intoxicação por *Sida carpinifolia* em caprinos. Do estudo da intoxicação natural por *Sida carpinifolia* em caprinos resultaram três artigos publicados em periódicos indexados. Um dos artigos descreve as investigações realizadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sobre a doença espontânea ocorrida no município de Lajeado, RS, em 1997, num rebanho de caprinos que apresentava quadro clínico de doença neurológica com incoordenação motora, ataxia e tremores musculares (Driemeier *et al.*, 2000). O segundo trabalho descreve a intoxicação por *Sida carpinifolia* incluindo outros dois surtos ocorridos no ano de 2001, no município de Glorinha e em Porto Alegre, RS (Colodel *et al.*, 2002a). Também será incluído neste trabalho o artigo publicado sobre a identificação de swainsonina em *Sida carpinifolia* (Colodel *et al.*, 2002b). Será descrita a reprodução experimental para caracterização das alterações clínicas e patológicas com metodologia, resultados, discussões e conclusões. Também como auxiliar no entendimento da patogenia da intoxicação por *Sida carpinifolia*, serão citados alguns dados obtidos paralelamente ao andamento deste experimento para o desenvolvimento da Tese de Doutorado de Marisete Bedin, orientada pelo Professor Roberto Giugliani do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos botânicos sobre *Sida carpinifolia*

Sida carpinifolia L.f. é uma Angiospermae da família Malvaceae. Tem como sinonímia *Sida acuta*, *Sida acuta* var. *carpinifolia* (L.f.) K. Schum., *S. acuta* spp. *carpinifolia* e é popularmente conhecida como guanxuma, malva-branca, chá-da-índia, vassoura (Kissmann & Groth, 1995; Lorenzi, 2000).

Sida carpinifolia floresce ao final da primavera e durante o verão, propaga-se apenas por sementes, a inflorescência é axilar, forma um subarbusto perene bastante ramificado e tem folhas e caules com fina pubescência esbranquiçada. É uma invasora de lavouras e pastagens, freqüente em solos arenosos nas planícies litorâneas. Em áreas de pastagens assume hábito semiprostrado com aproximadamente 70 cm de altura. Em áreas com baixa luminosidade, como em canaviais, atinge até 2,0m de altura (Kissmann & Groth, 1995; Lorenzi, 2000).

Popularmente infusões de *Sida carpinifolia* são utilizadas como emolientes, em afecções respiratórias, como tônica e também antipirética (Cruz, 1982; Lutzenberg, 1985). Quimicamente em *Sida carpinifolia* já foram evidenciados

ácidos oléico, linoléico, palmítico, esteárico, araquidônico e beta-sitosterol, hormônio ecdisteona (Lutzenberg, 1985), glicídio relacionado com as flavonas denominado rutina e quercitina, além de saponinas, taninos, cumarinas e flavanóides (Henriques *et al.*, 1989). Notou-se efeito espasmódico, similar ao que ocorre com o uso de acetilcolina *in vitro* (Prasad & Achari, 1966). Extratos metanólicos de *Sida carpinifolia* administrado oralmente causou infertilidade em ratos (Kholkute *et al.*, 1978).

2.2 Generalidades sobre doenças de depósito lisossomal

As células dos mamíferos são altamente diferenciadas e funcionalmente especializadas, exibindo padrões complexos de comunicações entre si. Essa relação é dada em parte por moléculas (hormônios, neurotransmissores, sistemas de transdução e modulação de sinais) do meio extracelular, internalizados pela célula (Maxfield & Mukherjee, 2004).

De Duve (1959) denominou de lisossomo a organela citoplasmática que contém diferentes enzimas hidrolíticas. Esta organela é o centro celular de catabolismo de macromoléculas, gerando aminoácidos, ácidos graxos, ácidos nucléicos e carboidratos para a síntese da célula (Agamanolis, 1995; King & Alroy, 2000). O lisossomo tem uma membrana simples de lipoproteína, mede de 0,2-0,8 μm , contém fosfatases, nucleases, glicosidases, proteases, peptidases, sulfatases e fosfoquinases que têm atividade em $\text{pH} \cong 5$ (Agamanolis, 1995).

As enzimas lisossomais são glicoproteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e transportadas para o aparelho de Golgi (AG).

Posteriormente essas hidrolases se ligam em receptores específicos no AG formam vesículas e são excretadas da organela. Nesse compartimento a enzima é liberada de seu marcador, tornando-se reativa. Por fagocitose, endocitose, e autofagia constituintes extra e intracelulares transportados, são catabolizados nos lisossomos, excretadas para o citosol e utilizadas para a síntese celular (Agamanolis, 1995). Normalmente, quase todas as hidrolases lisossômicas estão presentes em níveis de atividade suficiente, ocorrendo acúmulo do substrato, ou seja, doenças de depósito lisossomal (DDL) apenas quando a atividade residual de uma enzima está abaixo do limiar crítico de 10% da atividade enzimática normal.

Em casos suspeitos o diagnóstico da DDL pode ser estabelecido durante a gestação ou após o nascimento usando técnicas bioquímicas (Dahl *et al.*, 1999), morfológicas (Alroy *et al.*, 1987) e moleculares (Luzi *et al.*, 1997). A maioria das DDLs são diagnosticadas especificamente ao se demonstrar a atividade deficiente da enzima no plasma, em leucócitos ou em culturas de fibroblastos e em muitos casos pelo substrato não degradado que fica acumulado no interior do lisossomo de células afetadas ou quando são excretadas por via urinária (Warren & Alroy, 2000).

As primeiras descrições, reconhecidas atualmente como sendo DDL ocorreram por volta de 1820. Porém apenas no final do século XIX e início do século XX que dados clínicos e patológicos foram suficientes para confirmar algumas DDLs como Gaucher, Niemann-Pick e Tay-Sachs. Com o estudo ultra-estrutural dos lisossomos, desenvolveu-se a teoria de que defeitos em enzimas fossem a causa, por exemplo, do depósito de gangliosídeos na doença de Tay-Sachs. Em 1963, uma explanação geral para caracterizar causas de doenças de

depósito foi estabelecida, baseada em observações da deficiência em maltase ácida, uma hidrolase lisossomal, em um tipo de doença de depósito de glicogênio (Hers, 1963). Atualmente, em Humanos são conhecidas por volta de 40 DDLs, a maioria afeta o sistema nervoso central (Meikle *et al.*, 1999).

Grandes progressos no entendimento das DDLs vieram da identificação bioquímica das moléculas características de cada enfermidade, depositadas nas células. Isto antecedeu a identificação molecular da anomalia genética responsável por cada doença. A natureza do material bioquímico armazenado é uma importante ferramenta para classificação destas doenças. Seguindo este critério as principais DDLs são lipidoses, mucopolissacaridoses, glicogenoses, mucolipidoses, oligossacaridoses e lipofucinoses neuronais (Platt & Walkley, 2004). Recentemente com o entendimento do defeito genético molecular responsável pelo acúmulo de substâncias intracelulares se percebeu que fenótipos similares de DDLs têm defeitos moleculares radicalmente diferentes, estratégias terapêuticas distintas e que as alterações que causam as diferentes DDLs nem sempre residem em um defeito enzimático. A classificação das DDLs associadas ao defeito molecular, sem perder de vista a natureza do material armazenado, representa um avanço no estudo das DDLs (Platt & Walkley, 2004).

2.3 Generalidades sobre glicoproteinoses/oligossacaridoses.

O estudo da bioquímica dos carboidratos passou por uma grande renovação nas décadas de 1970 e 1980. Antes estas estruturas eram vistas como fontes de energia e ocasionais formadoras do esqueleto vegetal e animal (celulose

e quitina). Nos últimos 30 anos importantes observações foram somadas ao investigar a complexidade de funções que possuem os carboidratos no reconhecimento e na adesão celular (Sharon & Lis, 1993).

Os glicoconjugados são compostos formados pela união entre mono, oligo ou polissacarídeos conjugados com lipídeos ou proteínas. Os açúcares que formam os glicoconjugados denominam-se de glicanos. Os glicanos possuem funções intrínsecas como formar a membrana celular, matriz extracelular e modificar as características das proteínas (solubilidade e estabilidade) e funções extrínsecas que dependem da união com outros glicanos e proteínas (Taylor & Drickamer, 2003). Os glicoconjugados se dividem em glicolipídeos (compostos sempre ancorados às membranas) e glicoproteínas que podem ser de membranas ou secretados. As glicoproteínas resultam da glicosilação das cadeias peptídicas e podem ser classificadas em dois grupos, as que estão ligadas por meio de grupos hidroxila da serina ou treonina (O-ligadas) e as que estão ligadas por meio do grupo amino livre da asparagina (N-ligadas). Os oligossacarídeos N-ligados possuem uma união entre a asparagina e a N-acetilglicosamina em configuração beta. Os oligossacarídeos N-ligados sempre têm um núcleo comum de carboidratos e deste núcleo originam-se grupos terminais distintos: os ricos em manose e os complexos (King & Alroy, 1997).

A formação de oligossacarídeos N-ligados se inicia no retículo endoplasmático rugoso (RR). Glicanos se ligam ao lipídio dolicol, localizado em disposição espiral na membrana do RR, sendo transportado em bloco para a luz do RR. Este bloco inicial é composto por glicose₃manose₉N-acetil-glicosamina₂. Posteriormente o oligossacarídeo é transportado para o aparelho de Golgi (AG)

sendo modificado por distintas glicosiltransferases e glicosidases que agregam e removem monossacarídeos (Drickamer & Taylor, 1998).

A clivagem de oligossacarídeos ocorre seqüencialmente por glicosidases específicas, especialmente por alfa-fucosidase, beta-endo-N-acetilglicosaminidase, aspartilglicosaminidase, alfa-neuraminidase, beta-hexosaminidases, alfa-manosidase e beta-mansidase. A deficiência de uma destas enzimas resulta no acúmulo de produtos intermediários do catabolismo que caracterizam as doenças de depósito de oligossacarídeos (Taylor & Drickamer, 2003).

As DDLs agrupadas como glicoproteinoses, diferente da maior parte das outras DDLs têm predominantemente os oligossacarídeos específicos depositados e substratos não classificados como glicoproteínas, mesmo que em baixos níveis. Portanto oligossacaridoses seria um termo mais acurado para classificação genérica destas doenças (Platt & Walkley, 2004).

2.4 Considerações sobre alfa-manosidose

Durante o transporte de glicoproteínas para destinações intra ou extracelulares, os oligossacarídeos N-ligados, passam por modificações no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi para formar oligossacarídeos ricos em manose, híbridos ou complexos (Kornfeld *et al.*, 1982). A hidrólise enzimática das ligações manosídicas ocorre durante este processamento e também durante o processamento de glicoproteínas nos lisossomos (Winchester, 1984). Na biossíntese dos oligossacarídeos complexos, seis resíduos manosil derivados do

precursor 9-manose-N-acetilglicosamina são removidos, portanto diferentes manosidases estão envolvidas nessa reação (Fuhrmann *et al.*, 1985). Estruturalmente e geneticamente três tipos de alfa-manosidases com diferente pH ideal de atuação e localização intracelular são conhecidas, ácida ou lisossomal, intermediária ou de Golgi, neutra ou citosólica (Bischoff & Kornfeld, 1983).

Alfa-manosidose é caracterizada pelo depósito intracelular e excreção urinária de oligossacarídeos contendo manose, causado pela deficiência na atividade da enzima alfa-manosidase (Jolly *et al.*, 1981). Alfa-manosidose foi observada primeiro em bovinos da raça Angus (Whittem & Walkeer, 1957), ocorrendo também em humanos (Ockerman, 1967), em felinos domésticos (Burditt *et al.*, 1980; Maenhout *et al.*, 1988) e em cobaios (Muntz *et al.*, 1999; Crawley *et al.*, 1999). A ocorrência de manosidoses em seres humanos não é freqüente, porém é a DDL mais comum e economicamente importante em animais domésticos. Foi descrita em bovinos da raça Angus e cruzamentos, como Galloway e Murray Grey em rebanhos da Nova Zelândia, Austrália, Escócia, Estados Unidos e Argentina (Jolly, 1971; Jolly *et al.*, 1974; Jolly, 1993). Aproximadamente 10% dos Angus da Nova Zelândia eram heterozigotos para alfa-manosidose antes do início do programa de controle (Jolly, 1975). Em bovinos é uma doença neurológica hereditária autossomal recessiva caracterizada por ataxia, incoordenação, tremores de cabeça, tremores intencionais, tendência à agressividade, fraco desenvolvimento corporal e morte. Ocorrem variações fenotípicas de alfa-manosidose, especialmente relacionadas com a evolução da doença, variando de bezerros nascidos mortos até cursos clínicos de aproximadamente um ano (Healy *et al.*, 1990). Macroscopicamente há hidrocefalia moderada, aumento e palidez do

fígado e rim e artrogripose (Embury & Jerrett, 1985). As alterações histológicas, no sistema nervoso são vacuolização acentuada tornando o citoplasma dos neurônios de aspecto espumoso (“foamy”) no córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo e nas células de Purkinje do cerebelo. Esferóides axonais são achados constantes. Há também severa e consistente vacuolização espumosa no epitélio tubular renal, epitélio acinar do pâncreas, macrófagos reticulares de linfonodos e hepatócitos (Leipold *et al.*, 1979; Barlow *et al.*, 1981; Embury & Jerrett, 1985). Ultra-estruturalmente notam-se vacúolos, normalmente vazios excetos por fragmentos membranosos e ocasionalmente, material eletro-denso amorfo. Estes vacúolos normalmente estão circundados por membranas e sua estrutura é compatível com lisossomos (Jolly, 1971).

2.5 Doenças de depósito lisossomal associadas ao consumo de plantas que contém alcalóide swainsonina

Muitas DDLs são desordens genética, porém são de grande relevância na medicina veterinária aquelas, em herbívoros, induzidas pelo consumo de plantas tóxicas como as do gênero *Swainsona* na Austrália (Dorling *et al.*, 1978) e *Oxytropis* e *Astragalus* no Estados Unidos (James *et al.*, 1981) e Argentina (Robles *et al.*, 2000), *Ipomoea carnea* em Moçambique (Balogh *et al.*, 1999) e Brasil (Tokarnia *et al.*, 2000; Armien, 2000) e *Ipomoea hieronymi* var. *calchaquina* Argentina (Armesto *et al.*, 2004).

A doença clínica foi reconhecida em cavalos de Hermande de Soto e outros conquistadores espanhóis durante explorações na América do Norte no século XVI.

As primeiras descrições de intoxicação por plantas do gênero *Astragalus* e *Oxytropis* datam do início do século XVII, sendo a primeira planta tóxica descrita como causa de prejuízos aos rebanhos durante a ocupação do Oeste Americano (Kingsbury, 1964). Atualmente, a ocorrência de intoxicação por estas plantas, continua trazendo perdas econômicas importantes à costa Oeste dos Estados Unidos com morte de animais e custos de manejo dos rebanhos em áreas problemáticas (Stegelmeier *et al.*, 1998).

Aproximadamente 300 espécies de *Astragalus* e *Oxytropis* foram identificadas nos Estados Unidos, destas, 13 foram caracterizadas como causadoras de doença neurológica (James & Nielson, 1988). As espécies dos gêneros *Astragalus* e *Oxytropis* que causam DDLs são conhecidas como *locoweed* e a doença é chamada de *locoism* (Molyneux & James, 1982). A palavra *loco* originária do espanhol está associada às alterações clínicas neurológicas observadas nos animais afetados. Já as plantas do gênero *Swainsona* são chamadas de “ervilhas-venenosas” (*poison peas*) e os animais afetados denominam-se “pea struck” (James *et al.*, 1970). Estas plantas possuem o alcalóide indolizídínico denominado swainsonina que altera a atividade das enzimas alfa-manosidase lisossomal e da manosidase II do aparelho de Golgi (Dorling *et al.*, 1980; Molyneux & James, 1982). As primeiras demonstrações do efeito de swainsonina foram relacionadas com diminuição da atividade de alfa-manosidase lisossomal acreditando-se que causasse alterações fenotípicas similares as de alfa-manosidose congênita de humanos (Dorling *et al.*, 1978, 1980). Esta noção foi modificada quando se demonstrou que o alcalóide inibia também

alfa-manosidase II do aparelho de Golgi, ocorrendo, portanto alteração estrutural de glicoproteínas (Elbein *et al.*, 1981; Tulsiani *et al.*, 1982).

Duas outras plantas de interesse pecuário, principalmente para bovinos, com ocorrência clínica na Região Sul do Brasil, são importantes por causarem doença de depósito com sinais clínicos de distúrbios nervosos, são *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* (jurubeba) (Riet-Correa, 1993) e *Phalaris angusta* (Gava *et al.*, 1999). *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* causa vacuolização com deposição de glicolipídeos em lisossomos em células de Purkinje no cerebelo (Paulovich *et al.*, 2002). *Phalaris angusta* causa macroscopicamente coloração verde-azulada no tálamo, mesencéfalo e medula oblonga e microscopicamente há pigmento granular marrom-amarelado no citoplasma de neurônios (Souza & Irigoyen, 1999).

2.6 Swainsonina: inibidor do metabolismo de glicoproteínas

O alcalóide indolizidínico polihidroxilado, solúvel em água e de ocorrência natural, denominado de swainsonina, foi primeiro isolado da leguminosa *Swainsona canescens* (Colegate *et al.*, 1979). Posteriormente foi demonstrado em outras espécies do gênero *Swainsona* (Dorling *et al.*, 1980), em plantas do gênero *Astragalus* (Molyneux & James, 1982), do gênero *Ipomoea* (Molyneux *et al.*, 1995, Balogh *et al.*, 1999), sendo também produzido por fungos *Rhizoctonia legumnicola* (Schneider *et al.*, 1983) e *Metarhizium anisopliae* (Tamerler *et al.*, 1998). BRAUN *et al.* (2003), relatam a produção de swinsonina por fungos endófitos de *locoweed* sendo uma importante explicação para variação da quantidade de alcalóide em populações de *Astragalus* e *Oxytropis*. Atualmente várias técnicas descrevem a

produção sintética de swainsonina (Suami *et al.*, 1984; Pearson & Hembre, 1996; Fujita *et al.*, 2004). Os efeitos sobre a atividade de enzima lisossomal, foi demonstrado com a inibição do processamento de glicoproteínas ao adicionar swainsonina em células MDBK em meio contendo e hexose₉GlcNAc₂, infectadas ou não pelo vírus influenza, notando-se alteração na conversão de oligossacarídeos ricos em manose e complexos alterando a atividade da enzima alfa-manosidase (Elbein *et al.*, 1981).

Swainsonina inibe também a glicosilação de glicoproteínas com ligação asparagina em diferentes sítios de atividade da manosidase II do aparelho de Golgi (Tulsiani *et al.*, 1982). Swainsonina causa a formação de oligossacarídeos híbridos, combinando achados dos oligossacarídeos ricos em manose e complexos, tendo em um lado somente N-acetilglicosamina, galactose e ácido N-acetilneuraminico e em outra ramificação oligossacarídeos com manose ainda não processados (Gross *et al.*, 1982, Kang & Elbein, 1983). A estrutura do alcalóide swainsonina é similar à forma de um cátion intermediário da hidrólise da manose. Possivelmente a manosidase lisossomal e a manosidase II do aparelho de Golgi se ligam com swainsonina, ficando competitivamente inibidas. A natureza básica do alcalóide swainsonina causará alteração do o pH lisossomal contribuindo para diminuição da atividade da enzima (Dorling *et al.*, 1980).

2.7 Alterações clínicas e patológicas das intoxicações por plantas que contém Swainsonina

As principais alterações clínicas relatadas em casos naturais da intoxicação por plantas que contém swainsonina são notadas após o consumo diário consecutivo da planta, por várias semanas. O início dos sinais clínicos e a evolução clínica dependem do gênero e espécie da planta e da espécie animal envolvidos. Alterações neurológicas, reprodutivas e emaciação são freqüentemente descritas (James *et al.*, 1981). Nos animais afetados a perda ou diminuição do ganho de peso são achados comuns ocorrendo também depressão, déficits proprioceptivos (James & Kampen, 1971; Pritchard *et al.*, 1990; Pfister *et al.*, 1996; Stegelmeier *et al.*, 1998), dificuldade para acompanhar o rebanho, marcha alterada com passos curtos, cambaleios, dismetrias, hiperestesia e quedas freqüentes (Laws & Anson, 1968; Dorling *et al.*, 1978; Robles *et al.*, 2000). Nota-se também aparente cegueira com dificuldade para transpor ou debatendo-se sobre obstáculos (Pfister *et al.*, 1996; Robles *et al.*, 2000), além de nistagmo (Balogh *et al.*, 1999). São constantes as descrições de incoordenação (Dorling *et al.*, 1978; Stegelmeier *et al.*, 1998; Robles *et al.*, 2000) e de tremores musculares especialmente de cabeça e pescoço, principalmente quando os animais são movimentados (Pfister *et al.*, 1996; Balogh *et al.*, 1999). Com a contínua ingestão da planta com swainsonina as alterações motoras e sensoriais tornam-se acentuadas e os animais perdem a habilidade para se movimentar e permanecer em estação. O quadro clínico terminal pode ser bastante variável incluindo opistótonos, convulsões e estado comatoso (Pritchard *et al.*, 1990; Stegelmeier *et al.*, 1998). Descrevem-se efeitos reprodutivos adversos, causando malformação fetal, retardo na formação da

placenta, vascularização e placentação uterina reduzida ou com atraso, desenvolvimento cotiledonar reduzido, hidropsia de envoltórios fetais e abortos (James *et al.*, 1967; Van Kampen & James, 1969; 1971; James *et al.*, 1981; Panter *et al.*, 1989), no entanto trabalhos demonstram que swainsonina não causa alterações da placentação e desenvolvimento embrionário (Wang *et al.*, 1999).

Na necropsia a ausência de alterações significativas é freqüentemente descrita. Assimetria e atrofia do cerebelo foi achado em um caprino naturalmente intoxicado por *Ipomoea carnea* (Balogh *et al.*, 1999). Relata-se em bovinos, aumento do volume da tireóide (James *et al.*, 1971).

Microscopicamente a vacuolização e a tumefação do citoplasma de diferentes grupos de células, são os achados mais importantes em casos de ingestão de plantas que contém swainsonina. Os neurônios são as células mais constantemente afetadas, especialmente as células de Purkinje do cerebelo e os neurônios motores da medula espinhal (Laws & Anson, 1968; Armien, 2000). O sistema nervoso periférico pode estar afetado ocorrendo lesões nos plexos mioentéricos, celíaco e no trigêmeo (Stegelmeier *et al.*, 1998).

Os principais achados ultra-estruturais associados ao efeito de swainsonina no fígado e no rim foram os numerosos vacúolos pleomórficos e delimitados por membranas. No fígado os vacúolos ocorrem nos hepatócitos e células de Kupffer e no rim o epitélio tubular dos túbulos convolutos proximais está afetado. Os vacúolos estão vazios ou contêm materiais opacos de natureza heterogênea, presumivelmente resultante da degradação de constituintes citoplasmáticos. Técnicas imunoistoquímicas, com o uso da fosfatase ácida demonstraram que as membranas são estruturas ou partes do sistema lisossomal (Novikoff *et al.*, 1985)

Em relação à evolução das lesões histológicas no citoplasma de células afetadas, ocorre inicialmente vacuolização, posteriormente tumefação seguida de morte da célula com eosinofilia e encarquilhamento citoplasmáticos (James *et al.*, 1981). Em intoxicações prolongadas as células da glia podem estar afetadas. Degeneração axonal com tumefação axonal ou formação de esferóides axonais são comuns. Vacuolizações ocorrem também no epitélio folicular da tireóide, pâncreas exócrino, epitélio tubular renal, testículos, ovários e células linfóides. As primeiras alterações histológicas foram observadas 5 dias após o início do consumo de *locoweed* (Van Kampen & James, 1972).

O estudo cromatográfico da excreção urinária de oligossacarídeos em ovinos intoxicados com swainsonina demonstra alterações no padrão de excreção. Detectam-se 2-3 dias após o início do consumo, significativos aumentos na excreção de oligossacarídeos. O pico de excreção coincide com a severidade dos sinais clínicos e permanece elevada até o quarto dia após a suspensão da administração de swainsonina (Daniel *et al.*, 1984).

Análise *in vitro* da atividade enzimática em tecido hepático, no encéfalo e no plasma demonstra elevação significativa da atividade de alfa-manosidase, permanecendo elevada no transcorrer do estudo e voltando ao normal 1 dia após a retirada de swainsonina. A manosidase II do aparelho de Golgi tem a atividade reduzida 24 horas após o início do tratamento a níveis de 30% do normal, atingindo picos de 20% da atividade normal, restabelecendo os valores após 2 semanas do término da administração de swainsonina (Tulsiani & Touster, 1983).

2.8 Diagnóstico de intoxicação por plantas que contém o alcalóide Swainsonina

O diagnóstico da intoxicação por plantas que têm swainsonina é baseado no consumo da planta suspeita, identificação das alterações clínicas e patológicas que caracterizam a intoxicação, análise das concentrações séricas de swainsonina, análise da atividade da enzima alfa-manosidase no plasma, em leucócitos e em fibroblastos. O estudo cromatográfico da excreção de oligossacarídeos auxilia no diagnóstico. Histoquímica com lectinas tem se mostrado uma ferramenta diagnóstica de valor no estudo das DDL, incluindo aquelas induzidas por plantas tóxicas.

2.8.1 Uso de lectinas para caracterização de doença de depósito lisossomal

Lectinas são encontradas em muitos organismos, incluindo vírus, bactérias, e células de plantas e animais. Elas são purificadas por cromatografia de afinidade e mais recentemente por técnicas de DNA recombinante. Representam grupos heterogêneos de proteínas oligoméricas que varia em tamanho, estrutura, organização molecular assim como na constituição dos sítios de ligação. Os primeiros trabalhos, relacionados com lectinas, descreviam observações sobre o efeito do extrato de sementes de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius* aglutinando eritrócitos. Posteriormente se notou que a aglutinação dependia da espécie de origem dos eritrócitos. Atualmente as lectinas entre outras atividades, são usadas como auxiliares na caracterização de grupos e subgrupos sanguíneos (Hartmut, 1991).

Proteínas que interagem com carboidratos não covalentes ocorrem com abundância na natureza, por exemplo, os anticorpos anticarboidratos. As lectinas ligam-se de maneira reversível e com alta especificidade a mono e oligossacarídeos, são desprovidas de atividade catalítica e diferente dos anticorpos não são produzidas por uma resposta imune. Cada molécula de lectina possui tipicamente dois ou mais sítios de ligação com carboidrato. Quando as lectinas reagem com células não apenas se ligarão com açúcares de superfície, mas também causarão ligações cruzadas entre as células e subseqüentemente precipitação, referida como aglutinação. As lectinas também formam ligações entre glicoproteínas e polissacarídeos, quando em soluções, precipitando-os (Lis & Sharon, 1998).

O diagnóstico específico de doença de depósito é usualmente estabelecido ao demonstrar a deficiência da enzima em culturas de células como fibroblastos, células amnióticas, leucócitos e no plasma ou soro e a análise e caracterização de oligossacarídeos excretados na urina (Desnick *et al.*, 1973; Applegarth *et al.*, 1983). Os estudos histológicos e ultra-estruturais confirmam a DDL, porém não são ferramentas adequadas para caracterização etiológica (Desnick *et al.*, 1973; Dickersin *et al.*, 1980). As colorações especiais como ácido periódico de Schiff e Sudan black, indicam apenas o acúmulo de glicoproteínas, lipídeos ou glicose. Como contraponto, o uso de histoquímica de lectinas em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina pode revelar o produto específico depositados nas DDLs (Alroy *et al.*, 1984). O uso de lectinas no diagnóstico é de relevância em estudos retrospectivos, nos quais as técnicas convencionais são impraticáveis. As principais lectinas e especificidades estão listadas na Tabela 1. Em alfa-

manosidose há acúmulo de oligossacarídeos contendo resíduos alfa-manose e resíduos beta-N-acetil-glicosamina (GlcNAc) (Beauder, 1983). A lectina *Concanavalia ensiformis* (Con-A) liga-se mais especificamente com alfa-manose (Goldstein & Hayes, 1978). As lectinas do *Triticum vulgare* (WGA) e WGA-succinilado (s-WGA) marcam os resíduos GlcNAc (Monsigny *et al.*, 1980). Este padrão de marcação é notado em todas as espécies com deficiência de alfa-manosidose.

TABELA 1. Grupos de lectinas com receptiva afinidade a diferentes oligossacarídeos

Lectina		Oligossacarídeo preferencial ^a	Afinidade relativa ^b
Fonte	Abreviatura		
Manose ^c <i>Concanavalia ensiformis</i> <i>Escherichia coli</i> ^d <i>Vicia faba</i> <i>Galanthus nivalis</i> ^d <i>Lathyrus ochrus</i> <i>Lens culinaris</i> Soro camundongo <i>Phaseolus vulgaris</i>	ConA Fimbriae I Favin GNL LOL LCL MBP-A ^e PSL	Man α 6(Man α 3)Man Man α 6(Man α 3)Man octassacarídeos Hexassacarídeos/Fucose	130
N-acetilglicosamina <i>Gliffonia simplicifolia</i> <i>Triticum vulgaris</i>	GSII WGA	(GlcNAc β 4) ₃	3000
Galactose/N-acetilgalactosamina <i>Artocarpus integrifolia</i> <i>Dolichos biflorus</i> ^f <i>Erythrina corallodendrons</i> <i>Helix pomatia</i> ^g (scargot) <i>Phaseolus lunatus</i> ^f <i>Moluccella laevis</i> ^f <i>Arachis hipogaeai</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Glycine max</i> ^c	Jacalin DBL EcorL LBA MLL PNA RCA II SBA	Gal β 3GalNAc Gal NA α 3GalNAc Gal β 4GalNAc GalNAc α 3(fuc α 2)Gal Gal β 3GalNAc	36 ^g 30-50 ^h 43 ^{gi} 50 ⁱ
Fucose <i>Anguilla anguilla</i> <i>Lótus tetragonolopus</i> <i>Ulex europeus</i>	LTA UEA I	Fuc α 2Gal β 4GlcNAc β 6R	900
Ácido siálico <i>Sambucus nigra</i> <i>Limulus poluphemus</i>		NeuAc α 2,3gal NeuAc α 2,6GalNAc	30-60

Fonte: Goldstein & Hayes, 1978, Lis & Sharon, 1998

^aAbreviaturas usadas: Man= manose, fuc= fucose, Gal= galactose, GalNAc= N-acetilgalactosamina, Glc= glicose, GlcNAc= N-acetilglicosamina, NeuAc= ácido N-acetilneuraminico. ^bAfinidade relativa comparada aquela dos monossacarídeos, usualmente baseadas em técnicas de inibição da hemaglutinação. ^cMuitas lectinas deste grupo ligam-se a glicose, freqüentemente com afinidade similar. ^dLectinas que não ligam glicose. ^eChamada de Proteína de ligação manose (MBP) ela marca manose, N-acetilglicosamina e fucose com afinidade similar. ^fExibem preferência por N-acetilgalactosamina. ^gCom N-acetilgalactosamina como monossacarídeo de referência. ^hCom galactose como sacarídeo de referência. ⁱNão liga N-acetilgalactosamina.

2.9 Importância da *Sida carpinifolia* como planta tóxica de interesse pecuário

Além dos diagnósticos de intoxicação por *Sida carpinifolia* em caprinos relatados neste trabalho, outras ocorrências foram investigadas pelo Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. Em caprinos foram diagnosticados outros rebanhos afetados nos municípios de Dois Irmãos, Encantado, Gravataí e Triunfo, RS, todos afetando pequenos rebanhos, sem fins comerciais. Nesses surtos *Sida carpinifolia* predominava nas áreas onde os rebanhos pastoreavam. Em 1998, no município de Sapiranga, RS, mortes de pôneis foram atribuídas ao consumo de *Sida carpinifolia* após aproximadamente 21 dias da introdução dos animais em piquetes intensamente infestado pela planta (Loretti *et al.*, 2004). No município de Triunfo, RS e Maquiné, RS foram observados em bovinos que pastoreavam áreas invadidas por *Sida carpinifolia* lesões similares aquelas dos caprinos intoxicados por *Sida carpinifolia* (Driemeier, Dados não publicados). Em Santa Catarina registrou-se a ocorrência de casos de intoxicação natural por *Sida carpinifolia* em caprinos (Pilati², informações pessoais) e bovinos (Gava³, informações pessoais). Está sendo investigada a intoxicação por *Sida carpinifolia* em eqüinos no Estado do Pará (Tokarnia⁴, informações pessoais).

² Celso Pilati, Centro de Ciências Agroveterinárias, UDESC, Avenida Luiz de Camões, Bairro Conta Dinheiro, 2090, - Lages, Santa Catarina. Fone: (49) 221-2200.

³ Aldo Gava, Centro de Ciências Agroveterinárias Avenida Luiz de Camões, Bairro Conta Dinheiro, 2090, Lages - Santa Catarina. Fone: (49) 221-2200.

⁴ Carlos M.A.H. Tokarnia Departamento de Nutrição Animal e Pastagem, UFRRJ, Seropedica, RJ- Brasil Fone: (21) 26821081

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta, classificação botânica e processamento de *Sida carpinifolia*

Sida carpinifolia (Figura 1) foi coletada na Escola Técnica de Agricultura de Viamão, nos meses de dezembro e janeiro, de 2001, 2002 e 2003. O material coletado era secado, por aproximadamente 30 dias, em ambiente sombreado, seco e com ventilação ambiente. Posteriormente, em períodos próximos da administração da planta aos caprinos, as folhas e ramos eram moídos em triturador Nogueira®, modelo DPM4, peneira 5mm.

Amostras da planta, prensadas, foram encaminhadas para classificação botânica à Dr^a. Olinda Leites Bueno do Instituto Zoobotânico do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.



FIGURA 1. Aspectos da *Sida carpinifolia*. (a). área de pastagem invadida por *Sida carpinifolia*. (b). aspectos do arbusto. (c). detalhes das folhas alternadas e inflorescência axilar, (d). detalhes da Flor.

3.2 Animais experimentais

Foram usados para o desenvolvimento deste experimento 17 caprinos, seqüencialmente numerados de 1 a 17 e estão dispostos na Tabela 2, relacionados com idade, sexo, raça, período experimental e consumo médio diário de *Sida carpinifolia*. Os experimentos foram realizados em quatro etapas. Quatro caprinos foram usados como controle.

Inicialmente, para teste da toxicidade da planta seca, o grupo composto pelos Caprinos 1 e 2, recebeu a planta seca a vontade por um período de 105 dias.

Na segunda etapa, os Caprinos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 divididos em 3 grupos, receberam a planta seca, para ingestão espontânea, com controle diário de consumo, por períodos de 15, 20 e 40 dias nos diferentes grupos.

Na terceira etapa, os Caprinos 9, 10, 11, 12, 13 e 14 receberam *Sida carpinifolia* à vontade, pesando-se o consumo diário. O Caprino 9 consumiu a planta por 32 dias, os Caprinos 10 e 11 por 93 dias e os Caprinos 12, 13 e 14 por 93 dias e posteriormente foram privados do consumo de *Sida carpinifolia* por 40 dias.

Na quarta etapa o grupo composto pelos Caprinos 15, 16 e 17 recebeu *Sida carpinifolia*, durante 30 dias. Os Caprinos 15 e 17 foram acompanhadas por 15 dias e após o período de consumo de *Sida carpinifolia*. Para este grupo a dose de *Sida carpinifolia* triturada era pesada e posteriormente umedecida para formar uma pasta. Com o uso de uma seringa com a extremidade cortada, a pasta era administrada por via oral.

Durante o período experimental os caprinos foram mantidos em baia individual. Todos eram pesados semanalmente. Adicionalmente recebiam água à vontade, aproximadamente 200g de ração comercial para caprinos e feno de alfafa. O grupo controle recebeu feno de alfafa triturado além de ração e água em procedimento similar aos animais experimentais. O controle do consumo era feito se administrado, diariamente, doses conhecidas, repetidas sempre que estivesse terminando a dose anterior. As sobras eram pesadas ao final do dia.

3.3 Exame clínico dos animais experimentais

Durante o experimento os Caprinos eram observados diariamente, avaliando-se comportamento, movimentação espontânea e induzida, consistência das fezes, aspecto da urina e coloração de mucosas. Como preconizado por Pienaar *et al.* (1976) realizava-se diariamente o “head raising test” (HR test), que consiste em levantar a cabeça do animal, segura-la por alguns segundos e soltá-la de pronto. Com periodicidade semanal se avaliava frequência cardíaca, respiratória e movimentação ruminal por auscultação.

3.4 Coletas de amostras para análise no Serviço de Genética Médica do HCPA

Nos grupos de caprinos da terceira etapa, diariamente eram feitas coletas de sangue em tubos Vacutainer BD® contendo heparina sódica e também coleta de urina em coletor de urina infantil Markmed®. O sangue era mantido sob refrigeração e em um período máximo de 48 horas era encaminhado para Serviço de Genética Médica do HCPA. As amostras de urina eram congeladas em temperatura -20C° , assim mantidas até o final do experimento e encaminhadas para Serviço de Genética Médica do HCPA.

Na etapa 4 coletou-se diariamente sangue total em tubos Vacutainer BD® com heparina sódica, urina em coletor de urina infantil Markmed® e biópsias de pele da orelha, coletados como segue: após bloqueio anestésico (lidocaina), anti-sepsia local, a extremidade da orelha de aproximadamente 3 mm de diâmetro era pinçada e incisada. O fragmento era imediatamente colocado em meio HAM e encaminhado para Serviço de Genética Médica do HCPA.

A metodologia de análise e resultados obtidos com a atividade de enzimas no plasma sanguíneo, leucócitos e em fibroblastos e análise de resíduos de oligossacarídeos urinários são parte da tese de Doutorado de Marisete Bedin, orientada pelo Dr. Roberto Giugliani.

3.5 Procedimentos para eutanásia dos animais experimentais

Após o período experimental, com exceção dos Caprinos 15 e 17, todos os Caprinos foram eutanasiados, incluindo o grupo controle. O procedimento de eutanásia, analisado e aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Hospital de Clínica de Porto Alegre, com base em recomendações constantes na Resolução Nº. 714, de 20 de Junho de 2002 do Conselho Regional de Medicina Veterinária foi realizado com o seguinte protocolo:

- 1- Tranqüilização com Acepromazina (ACEPRAN® 1%) – 0,2mg/kg
- 2- relaxamento muscular com cloridato de xilazina (Rompum® 2%)- 0,05mg/kg
- 3- anestésico geral com barbitúricos - a termo

3.6 Estudo das alterações morfológicas

3.6.1 Exame macroscópico

Após eutanásia os animais foram necropsiados. Durante a necropsia coletaram-se amostras de fígado, rim, linfonodos mesentéricos e mediastínicos, baço, rúmen, retículo, omaso, abomaso, segmentos intestinais, plexo celíaco, adrenal, pâncreas, esôfago, pulmão, coração, músculo esquelético, nervo periférico

(ciático na região femoral), olho, aparelho reprodutor e gânglio trigêmeo. O encéfalo e medula foram coletados inteiros. Os materiais coletados foram fixados em solução formalina 10% tamponada.

3.6.2 Análise histológica

Após adequadamente fixadas, as vísceras, incluindo sistema nervoso central (SNC), foram cortadas e processadas rotineiramente para exame histológico. Do encéfalo cortes transversais de 5 regiões foram sistematicamente estudadas (Figura 2). As regiões analisadas consistiam de 1. corte transversal do córtex cerebral e corpo estriado sobre o quiasma ótico, 2. corte transversal do córtex cerebral e tálamo sobre o corpo mamilar, 3. mesencéfalo cortado transversalmente sobre colículo rostral, 4. secção transversal do cerebelo e medula oblonga sobre o corpo trapezóide, 5. secção transversal da medula oblonga sobre o óbex (Figura 3). A medula era a contada transversalmente sobre a região cervical, intumescências cervical e lombar. Todas as secções histológicas foram rotineiramente coradas por hematoxilina e eosina (HE) e secções do cerebelo, fígado, rim e tireóide, dos Caprinos 1, 2 e 12, foram coradas pela técnica de PAS (ácido periódico Schiff) e Ziehl-Neelsen contracoradas com hematoxilina de Mayer (Prophet *et al.*, 1992).

3.6.3 Histoquímica de Lectinas

Secções histológicas do cerebelo, de todos os caprinos deste estudo foram submetidas a uma bateria de histoquímica com lectinas similar ao descrito por

Driemeier *et al.* (2002). As secções, depois de desparafinadas e hidratadas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 0,3% e metanol 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 1% em PBS, por 30 minutos. Posteriormente, foram incubadas com lectinas biotinizadas por 2 horas, seguido por incubação com complexo peroxidase-avidina-biotina (ABC) por 30 minutos. A peroxidase foi marcada por incubação 1 minuto com solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo diaminobenzidina (DAB) 0,02% e H₂O₂ 0,05%. Todas as secções foram contracoradas com hematoxilina de Mayer e analisadas por microscopia ótica.



FIGURA 2. (a). Vista dorsal e (b) ventral do encéfalo de caprino com demarcações das áreas seccionadas para o estudo histológico das alterações causadas pela ingestão de *Sida carpinifolia* em caprinos.

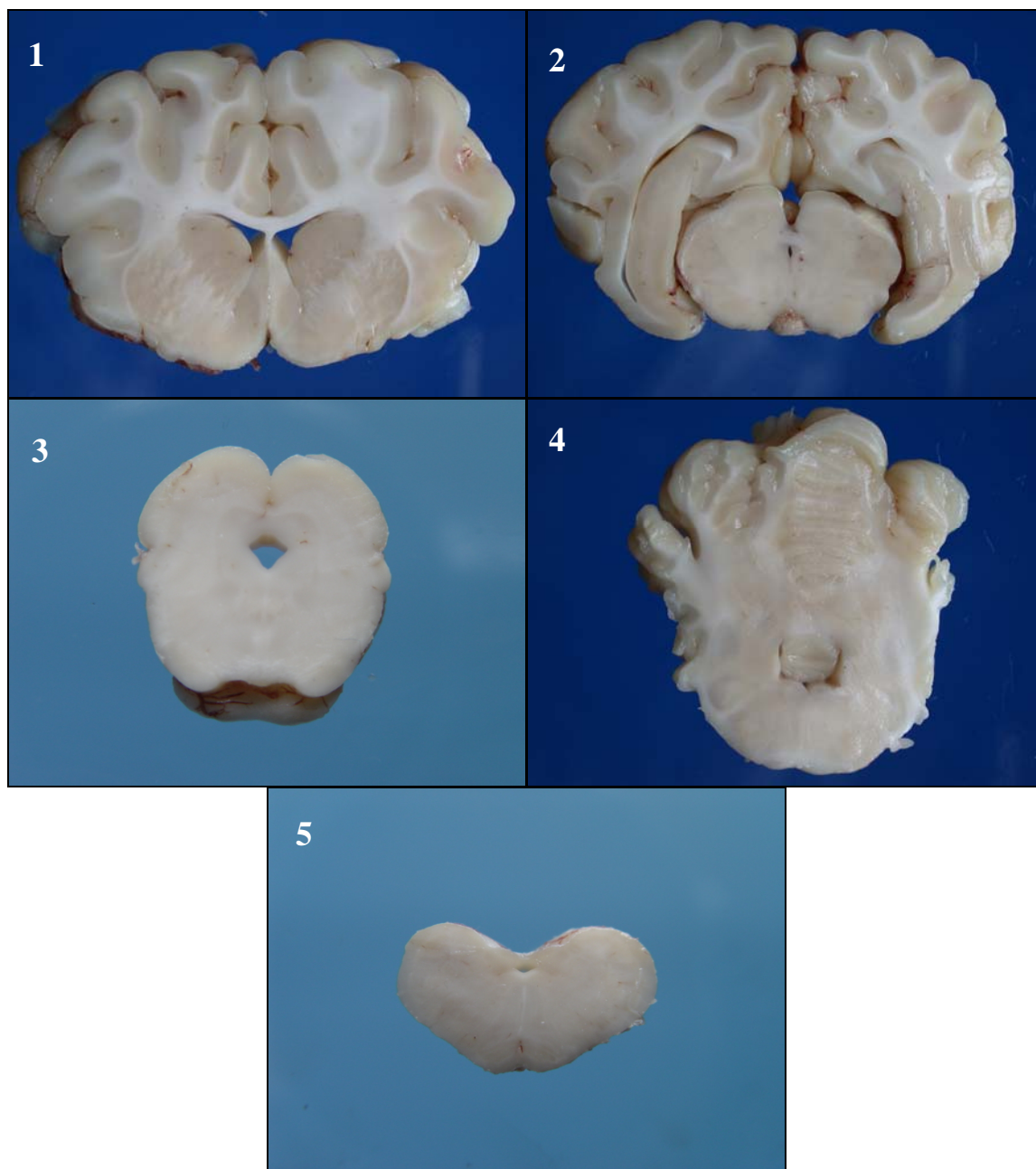


FIGURA 3. Áreas de secção do encéfalo para estudo das alterações histológicas associadas ao consumo de *Sida carpinifolia* em caprinos. (1). secção transversal do córtex cerebral e corpo estriado sobre o quiasma óptico, (2). secção transversal do córtex cerebral e tálamo sobre o corpo mamilar, (3). secção transversal do mesencéfalo sobre o colículo rostral, (4). secção transversal do cerebelo e medula oblonga sobre o pedúnculo cerebelar médio, (5). secção transversal da medula oblonga sobre o óbex.

3.6.4 Estudo ultra-estrutural

Fragmentos medindo aproximadamente 3mm, do córtex cerebelar, tireóide, pâncreas e fígado dos Caprinos 1 e 2 foram fixados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato. Posteriormente as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídas em Epon. Os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão.

TABELA 2. Características dos caprinos experimentalmente intoxicados por *Sida carpinifolia*. Demonstração do consumo médio e duração do período experimental com e sem consumo de *Sida carpinifolia*.

Caprino	Idade Meses ^a	Sexo	Raça	Dias consumo	Dias sem consumo	Consumo diário médio/g/kg
1	36	M ^b	SRD ^d	105	0	14
2	24	F ^c	SRD	105	0	15
3	6	M	Saanen	15	0	18
4	6	M	Saanen	15	0	19
5	11	M	Saanen	20	0	18
6	11	M	Saanen	20	0	16
7	11	M	Saanen	40	0	21
8	11	M	Saanen	40	0	19
9	6	M	Saanen	32	0	14
10	6	M	Saanen	93	40	18
11	6	M	Saanen	93	0	17
12	6	M	Saanen	93	0	16
13	6	M	Saanen	93	40	17
14	6	M	Saanen	93	40	17
15	48	F	Saanen	30	15	10
16	48	F	Saanen	30	0	10
17	48	F	Saanen	30	15	13

^aIdade no início do experimento; ^bmacho, ^cfêmea, ^dsem raça definida.

4 RESULTADOS

4.1 Achados Clínicos

Nas diferentes etapas deste experimento sobre intoxicação por *Sida carpinifolia* em caprinos, o quadro clínico observado foi caracterizado por alterações na consistência das fezes, emagrecimento ou diminuição no ganho de peso e principalmente sinais clínicos neurológicos.

Alterações de consistência das fezes foram notadas em todos os animais do experimento, com exceção dos Caprinos 15, 16 e 17, normalmente ocorrendo na primeira semana após o início da administração de *Sida carpinifolia*. As fezes tornavam-se pastosas, raramente líquidas e com coloração esverdeada. O curso clínico destes episódios era de 24-48 horas. Os Caprinos 7, 9, 12 e 13 repetiram aleatoriamente esses episódios. Durante esses períodos, não foram notadas alterações na auscultação dos parâmetros clínicos.

A Tabela 3 traz relações de peso dos caprinos experimentais e controles do início ao término do consumo de *Sida carpinifolia* e também do período que os caprinos em experimento não receberam a planta. A média de ganho de peso nos

Caprinos controles durante os 133 dias em que foram acompanhados, ficou em $88\pm 35\text{g/dia}$. Nos caprinos, que estavam consumindo *Sida carpinifolia* em média houve perda do peso corporal de aproximadamente $26\pm 66\text{g/dia}$. Os Caprinos 10, 14, 15 e 17, que deixaram de receber *Sida carpinifolia* voltaram a ganhar peso em média de $119\pm 110\text{g/dia}$. Além das alterações observadas em relação ao peso corporal notou-se também que os animais em experimento tinham pelagem grosseira e sem brilho (Figura 4).

TABELA 3. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos. Demonstração do peso médio dos Caprinos durante o período experimental com e sem consumo de *Sida carpinifolia*.

Caprino	Período (dias)		Peso (Kg)	Variação		Variação média peso g/dia
	Com <i>Sida carpinifolia</i>	Sem <i>Sida carpinifolia</i>		Pré	Consumo	
3	15	0	33	31	-	-134
4	15	0	29	27	-	-133
5	20	0	28	28	-	0
6	20	0	33	28	-	-250
7	40	0	32	31	-	-25
8	40	0	27	25	-	-50
9	32	0	30	28	-	-63
10	93	40	28	26	32	^a 22 / ^b 188
11	93	0	28	32	-	43
12	93	0	23	24	-	11
13	93	40	28	28	34	0
14	93	40	23	24	33	^a 11/ ^b 273
15	28	15	50	52	52	^a 71/ ^b 0
16	28	0	48	52	-	143
17	28	15	60	60	61	^a 0/ ^b 16
Controle1	0	133	23	-	44	158
Controle2	0	133	25	-	33	75
Controle3	0	133	22	-	30	60
Controle4	0	133	22	-	32	105

^avariação de peso durante o consumo da planta

^bvariação diária de peso após privação do consumo de *Sida carpinifolia*

Os sinais clínicos neurológicos, observados nos caprinos que consumiram *Sida carpinifolia*, variaram de acordo com o período de consumo. De maneira geral alterações discretas aconteciam entre a primeira e segunda semana de consumo e consistiam em aparente depressão, olhar embotado e movimentação lenta com passos mais curtos. Estas alterações persistiram durante o período que os caprinos consumiram *Sida carpinifolia*. As alterações clínicas consideradas leves consistiam de incoordenação motora e tremores musculares de cabeça e pescoço e leve balançar de cabeça em situações de estresse como a movimentação e o “HR test”. Raramente apresentavam quedas durante este exame clínico. Estes sinais foram observados em média aos 36 dias após o início do consumo de *Sida carpinifolia*, ocorrendo precocemente aos 28 dias nos Caprinos 7 e 15 e tardiamente aos 45 dias no Caprino 1. Os sinais clínicos moderados (Figura 5), caracterizados por incoordenação motora, dismetria, tremores musculares de pescoço e membros, balançar de cabeça mesmo quando os caprinos não eram movimentados e dificuldade para se levantar após decúbito, além de quedas em posições atípicas ao HR test. Esse quadro clínico foi observado em média aos 58 dias após o início do experimento variando de 40 dias no mínimo nos Caprinos 7 e 8 e 87 dias no Caprino 11 (Figura 6). Os Caprinos 1, 2 e 14 demonstraram sinais clínicos acentuados, caracterizados por intensa incoordenação motora, com marcada dismetria, tremores musculares acentuados no pescoço e membros, balanço de cabeça e pescoço, quedas freqüentes, dificuldade para beber água e apreender alimentos, decúbitos prolongados em posições atípica e marcada dificuldade para voltar a estação. Nessa fase havia também contrações clônicas, nistagmo e dificuldade para transpor obstáculos como subir e descer rampas e

passar por canaletas. Nos caprinos que permaneceram em observação após o período de consumo de *Sida carpinifolia*, notou-se que os sinais clínicos foram gradativamente reduzindo em intensidade e após 15 dias não se notavam alterações clínicas. No *HR test* havia alterações clínicas leves até o 22º dia.

TABELA 4. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos. Relação do início dos sinais clínicos e intensidade do quadro clínico com a evolução do experimento.

Caprino	Dias consumo	Consumo diário médio/g/kg	Início dos Sinais clínicos neurológicos (dias)			
			A	B	C	D
1	105	14	8	45	60	92
2	105	15	11	43	78	90
3	15	18	7	-	-	-
4	15	19	7	-	-	-
5	20	18	7	-	-	-
6	20	16	7	-	-	-
7	40	21	7	28	40	-
8	40	19	7	32	40	-
9	32	14	10	26	-	-
10	93	18	14	35	48	-
11	93	17	14	40	87	-
12	93	16	14	38	50	-
13	93	17	10	36	60	-
14	93	17	13	42	60	85
15	30	10	10	28	-	-
16	30	10	10	-	-	-
17	30	13	12	-	-	-

A- sinais discretos com movimentação lenta e olhar embotado; B- sinais leves com incoordenação e tremores induzidos C- sinais moderados com incoordenação e tremores espontâneos, D- quedas e dificuldade para manter estação.



FIGURA 4. Caprino após 15 dias de consumo experimental de *Sida carpinifolia*, demonstrando pelagem grosseira. Há também fezes pastosas no piso da baia.



FIGURA 5. Caprino 11 após 35 dias de consumo de *Sida carpinifolia* apresentando fraco desenvolvimento corporal, pêlos arrepiados e dismetria durante movimentação.



FIGURA 6. Caprino 11 experimentalmente intoxicado com *Sida carpinifolia*, em uma seqüência de imagens aos 90 dias de consumo. Inicialmente em decúbito lateral com dificuldade para ficar em estação demonstrando pedalagem e posteriormente com incoordenação.

4.2 Achados patológicos

4.2.1 Alterações macroscópicas

Em todos os caprinos necropsiados os linfonodos mesentéricos estavam edematosos, com aumento de volume, deixando fluir ao corte líquido transparente ou levemente opaco.

4.2.2 Alterações histológicas

Graus variados de vacuolização que conferiam aspecto espumoso e tumefeito ao citoplasma celular de neurônios do sistema nervoso central e periférico, células foliculares da tireóide, células acinares pancreáticas, foram os principais achados microscópicos. Inconstantemente nota-se vacuolização em neurônios de gânglios periféricos, no epitélio de ductos de glândulas salivares, epitélio do epidídimo e macrófagos reticulares nos órgãos linfóides. No encéfalo os principais neurônios afetados foram às células de Purkinje do cerebelo. Outros grupos de neurônios também foram afetados em diferente intensidade como os neurônios granulares, do corno ventral do H medular, dos núcleos da medula oblonga, mesencéfalo, tálamo, corpo estriado e córtex do encéfalo. As alterações variaram de acordo com a evolução clínica. Nos Caprinos 3 e 4, que consumiram *Sida carpinifolia* por 15 dias as lesões foram consideradas discretas (Figura 7 e 8). Nesses caprinos a maioria dos neurônios de Purkinje não apresentavam alterações e alguns apresentavam vacuolização espumosa citoplasmática discreta. Havia vacuolização moderada em células acinares pancreáticas, de epitélio de ductos de glândulas salivares e foliculares da tireóide. Adicionalmente no Caprino 3 havia vacuolização leve de macrófagos reticulares do baço e linfonodos e de plexos mioentéricos. Nos caprinos 5 e 6 e 9 e 16 que consumiram a planta por 20 dias e 30 dias respectivamente havia vacuolização leve nos neurônios de Purkinje, nos neurônios da medula espinhal, especialmente os localizados no corno ventral do H medular na região das intumescências cervical e lombar principalmente (Figura 9). Notou-se também vacuolização moderada do epitélio folicular da tireóide e do epitélio acinar pancreático. Nos Caprinos 7 e 8, após 40 dias de consumo de *Sida*

carpinifolia, notou-se vacuolização espumosa e tumefação moderada do citoplasma das células de Purkinje, dos neurônios do corno ventral da medula espinhal, das células do pâncreas exócrino, do epitélio folicular da tireóide, do epitélio do epidídimo, do epitélio dos ductos das glândulas salivares. Vacuolização leve de neurônios da medula oblonga, dos gânglios trigêmeo, plexos de Meissner e Auerbach do trato gastrointestinal. Nos Caprinos 1, 2, 11 e 12, que consumiram *Sida carpinifolia* por períodos de 93-105 dias as lesões eram similares e caracterizadas por intensa vacuolização e tumefação citoplasmática das células de Purkinje, alterações moderadas foram observadas nos neurônios do corno ventral da medula espinhal, no epitélio do ácino pancreático, as células foliculares da tireóide, e no epidídimo. Adicionalmente principalmente na camada granular do cerebelo em núcleos cerebelares e da medula oblonga, havia esferóides axonais de tamanhos variáveis (Figura 10 e 11). No cerebelo notaram-se grupos de células de Purkinje com núcleo picnótico, citoplasma eosinofílico e bordos citoplasmáticos irregulares. Estas células tinham forte marcação na coloração de PAS e inconstante marcação com intensidade, de leve à moderada na coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 12). Estes achados foram também observados nos Caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 93 dias e foram sacrificados 40 dias após o término do consumo. Neste grupo de Caprinos não se notou vacuolização citoplasmática como aquelas dos caprinos sacrificados imediatamente ao término do período de consumo de *Sida carpinifolia*.

TABELA 5. Intensidade de lesão (vacuolização e tumefação do citoplasma) em diferentes áreas do sistema nervoso central e periférico, pâncreas e tireóide em caprinos experimentalmente intoxicados por *Sida carpinifolia*.

Caprino	Dias consumo	Consumo médio diário g/kg	SNC 1	SNC 2	SNC 3	SNC4	SNC 5	Medula espinhal	SNP	Pâncreas	tireóide
1	105	14	1 ^A	1	2	3	2	1	1	3	4
2	105	15	1	2	1	3	2	2	1	3	4
3	15	18	1	1	1	2	2	2	0	2	1
4	15	19	1	1	1	2	1	1	0	3	2
5	20	18	1	1	2	2	1	1	0	1	2
6	20	16	1	1	2	2	3	2	2	2	2
7	40	21	2	2	2	3	4	NA	2	2	3
8	40	19	2	1	2	2	2	3	0	1	1
9	32	14	0	1	0	1	0	1	0	1	1
11	93	17	3	2	3	4	2	2	2	3	2
12	93	16	2	1	2	3	1	1	1	2	2
16	30	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

SNC1 córtex cerebral e corpo estriado em corte transversal sobre o quiasma ótico; SNC2- córtex cerebral e tálamo em corte transversal sobre corpo mamilar; SNC3- mesencéfalo em corte transversal sobre colículo caudal; SNC4- cerebelo em corte transversal sobre braço da ponte; SNC5- medula oblonga em corte transversal sobre óbex. A medula espinhal foi avaliada em cortes transversais sobre C3, intumescências cervical e lombar; SNP-Sistema nervoso periférico consistia de avaliações do gânglio trigêmeo e celíaco e dos plexos mioentéricos. ^AAs avaliações são de caráter subjetivo em relação aos controles e numericamente classificadas de 1-4 sendo 1-lesões discretas; 2- lesões leves; 3 lesões moderadas e 4 lesões acentuadas, 0- ausência de alterações histológicas. NA - não analisado

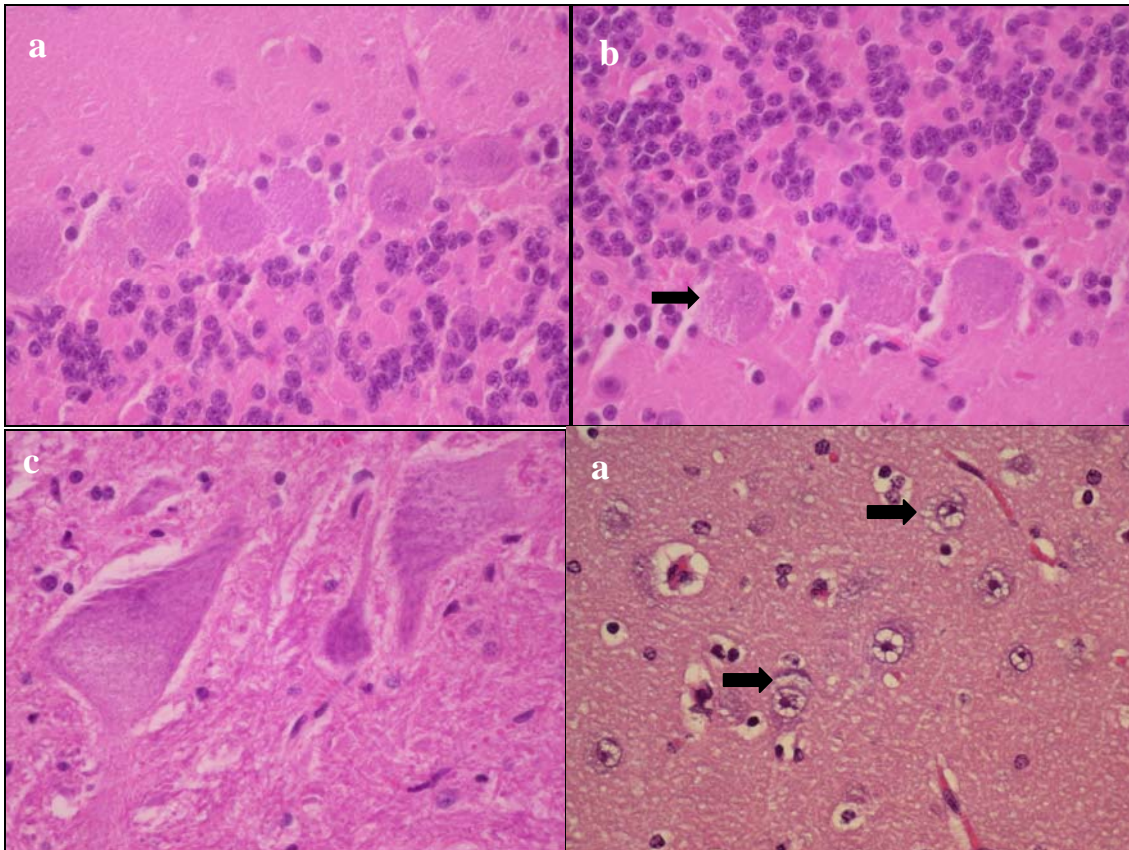


FIGURA 7. Alterações histológicas discretas no sistema nervoso central de caprinos após o consumo de *Sida carpinifolia* por 15 dias. (a) A maior parte das células de Purkinje estão histologicamente normais, HE. 200x (b) por vezes elas estão finamente vacuolizadas (seta), HE, 200x, (c) há vacuolização de neurônios do corno ventral da medula espinhal, HE 400x, (d) e em neurônios do córtex cerebral (seta), HE. 100x.

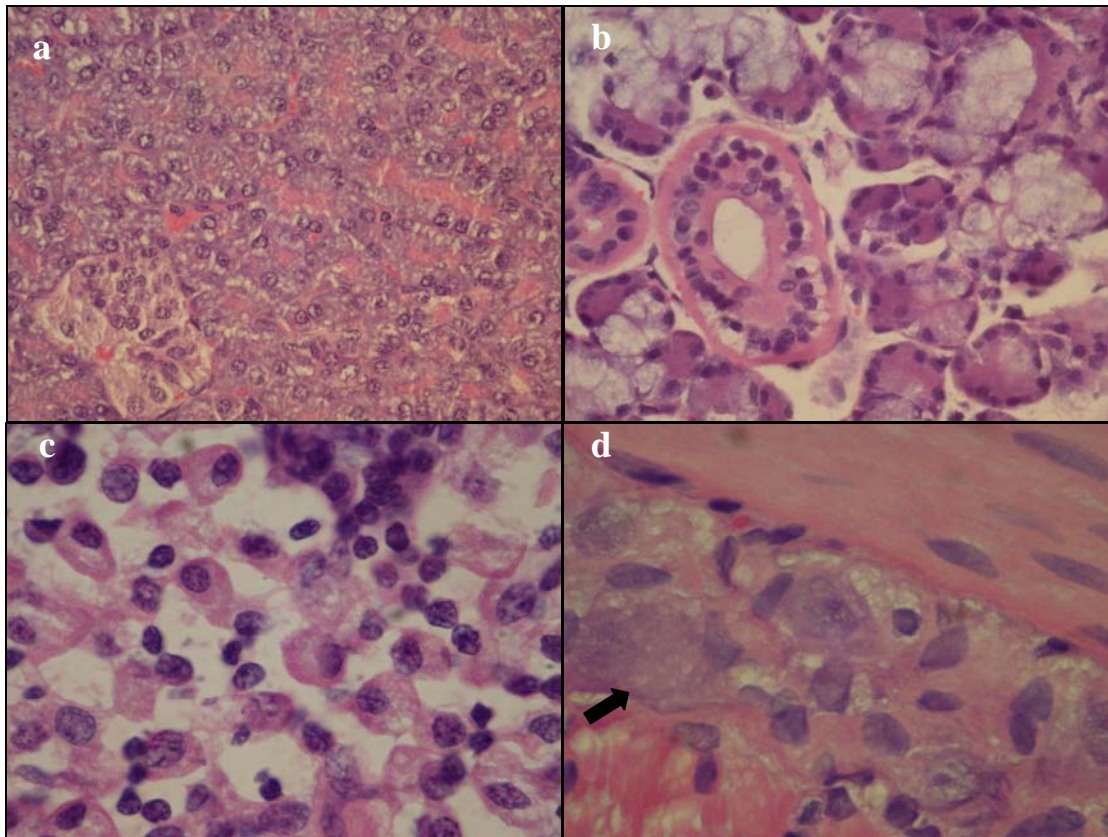


FIGURA 8. Achados histológicos em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 15 dias. Vacuolização moderada do epitélio do pâncreas (a), HE, 100x, e ductos de glândulas salivares (b), HE, 100x. No Caprino 3 havia vacuolização de macrófagos reticulares de linfonodos (c), HE, 200x, e de neurônios de plexos mioentéricos (d), HE, 400x.

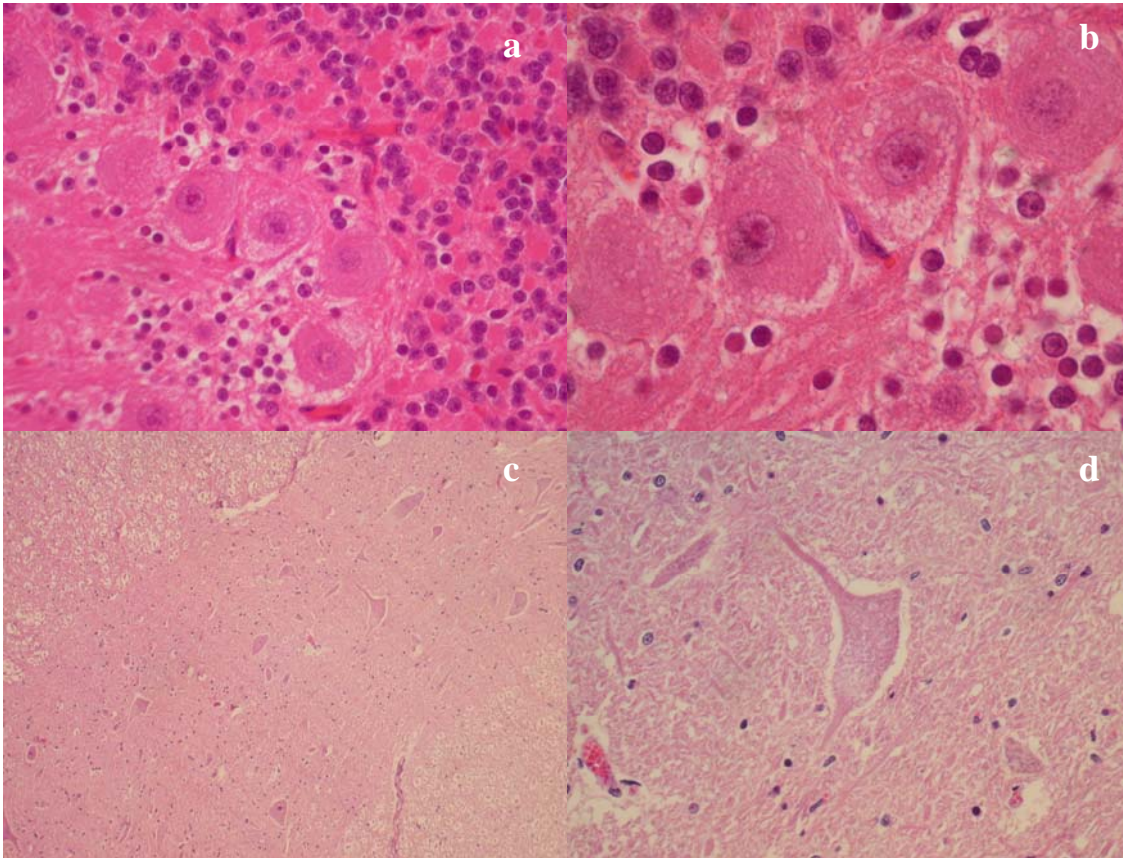


FIGURA 9. Alterações histológicas encontradas em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 20 e 30 dias. (a). Nota-se leve vacuolização de neurônios de Purkinje HE, 200x, e (b) HE 400x, (c). há vacuolização de neurônios do corno ventral da medula espinhal, HE, 40x, (d) HE, 400x.

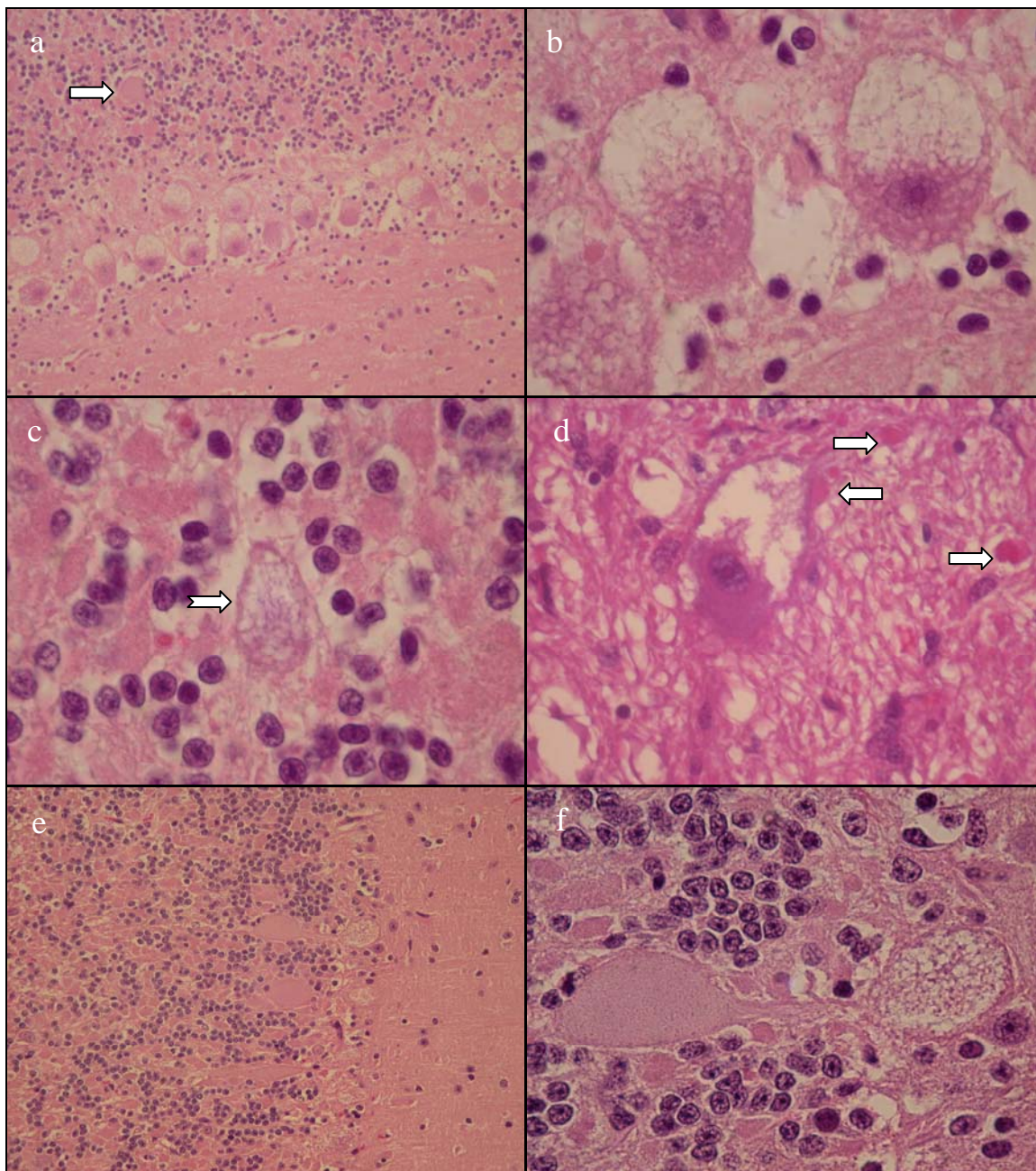


FIGURA 10. Achados histológicos no cerebelo de caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por mais de 90 dias. (a) difusa tumefação e vacuolização de células de Purkinje e esferóide axonal na camada granular (seta) HE, 100x, (b) ampliação da imagem anterior para observação da tumefação e vacuolização do citoplasma da célula de Purkinje, HE, 400x, (c) camada granular do cerebelo com vacuolização de neurônio de Golgi (seta), HE, 400x, (d), neurônio de núcleo cerebelar tumefeito e vacuolizado e múltiplos esferóides eosinofílicos (seta), HE, 400x, (e) vacuolização de células de Purkinje e tumefação axonal na camada granular, HE, 100x, (f) ampliação da imagem anterior, HE, 400x.

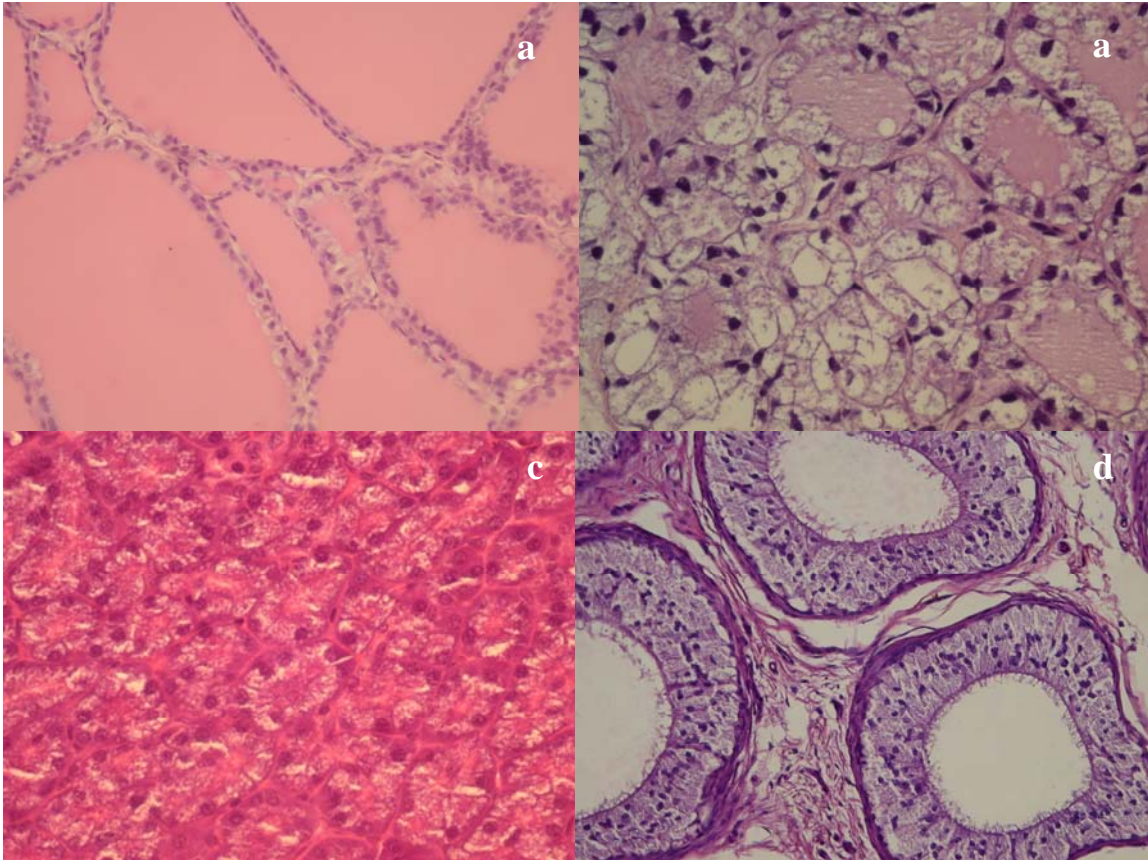


FIGURA 11. Achados histológicos em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por 93 dias. (a) Vacuolização moderada difusa do epitélio folicular da tireóide, Caprino 11, HE, 40x, (b) vacuolização acentuada no epitélio folicular da tireóide do Caprino 1, HE, 200x, (c). no Caprino 1 nota-se difusa e moderada do epitélio acinar do pâncreas HE, 200x, e (d) do epitélio do epidídimo, HE, 200x.

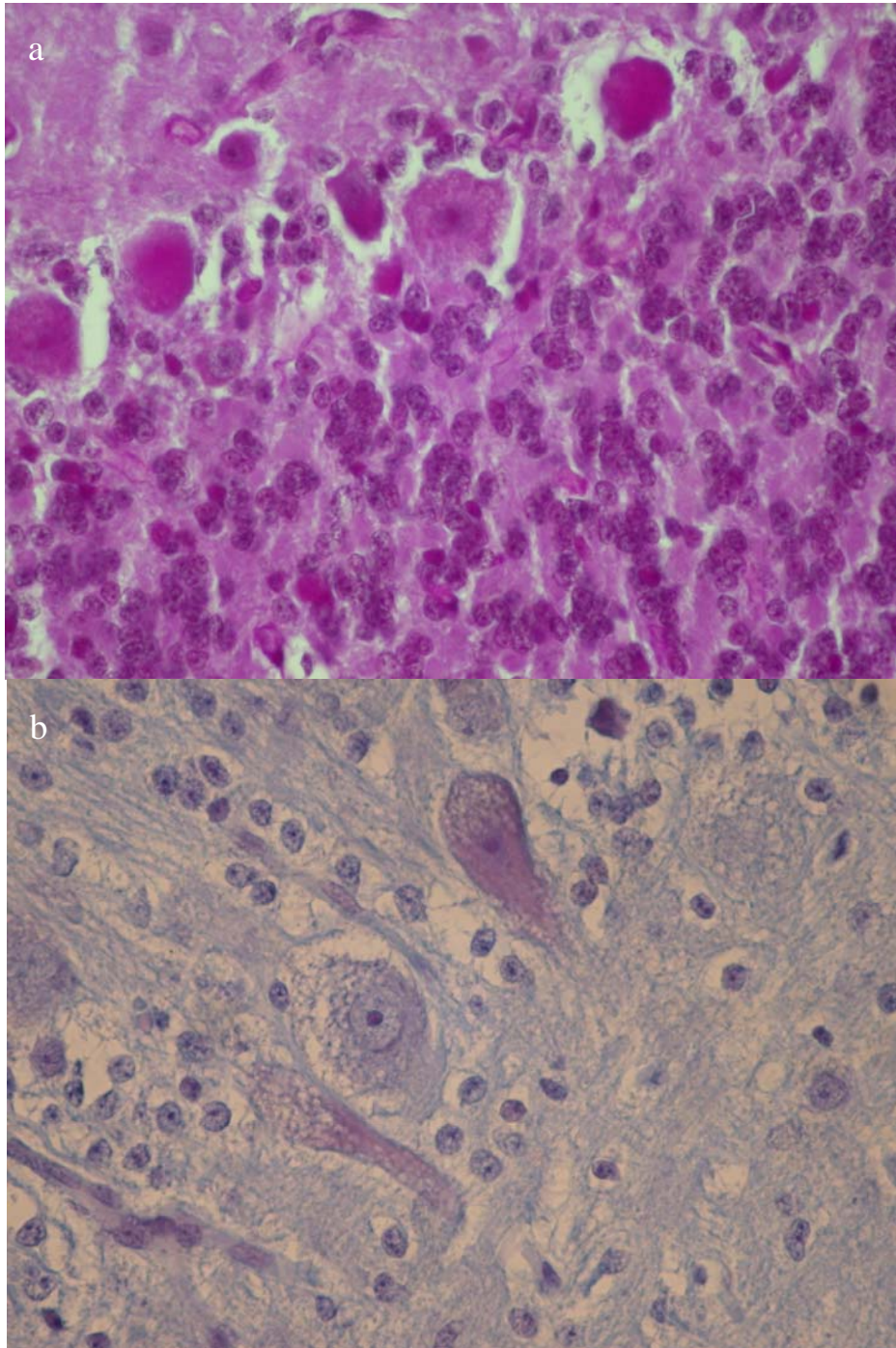


FIGURA 12. Demonstração de marcação no citoplasma de neurônios do Caprino 1, que consumiu a planta por 105 dias. (a). Forte marcação citoplasmática de neurônios de Purkinje com ácido periódico de Schiff. PAS, 200x, (b). marcação do citoplasma das células de Purkinje na coloração de Zielh-Neelsen contracorada com Hematoxilina de Mayer. ZH, 400x.

4.2.3 Histoquímica com lectinas

O citoplasma de células de Purkinje, neurônios granulares e de Golgi, neurônios da camada molecular, neurônios dos núcleos cerebelares tiveram maior intensidade de marcação em relação aos controles com *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA) e Succinil WGA (sWGA) (Figuras 13 e 14). A intensidade de marcação em grupos de neurônios do cerebelo, com estas 3 lectinas, está disposta na Tabela 5.

4.2.4 Achados ultra-estruturais

Ultra-estruturalmente, nos Caprinos 1 e 2, no citoplasma de células de Purkinje, células do epitélio acinar do pâncreas e epitélio folicular da tireóide foram observados vacúolos delimitados por membrana por vezes contendo material finamente granular ou fragmentos de membranas. Adicionalmente no epitélio pancreático havia grânulos de secreção e em alguns vacúolos corpos residuais. Na tireóide havia restos celulares na luz folicular e nas células C da tireóide não foram notadas alterações. No fígado os hepatócitos não estavam vacuolizados, havia vacúolos em células de Kupffer e células endoteliais (Figura 15).

TABELA 6. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Intensidade de marcação das lectinas de *Triticum vulgare*, de *Triticum vulgare succinilada* e de *Concanavalia ensiformis* nos diferentes grupos de neurônios do cerebelo relacionados com o período de consumo de *Sida carpinifolia*.

Lectina		Dias de consumo							
		15	20	30	40	90	93/40	120	controle
sWGA	P	2 ^a	2	3	3	3	0	3	0 ^b
	Gr	1	3	3	3	2	1	2	1 ^c
	M	2	2	1	4	3	0-1	2	1
	G	3	3	4	3	3	1	3	1
	N	4	NA	NA	3	4	1	4	1 ^b
	E	-	-	-	-	0-1 ^c	-	0-1 ^c	-
WGA	P	2	2	2	2	2	1	3	1
	Gr	1	1	1	1	1	0	1	1
	M	1	1	1	1	1	0	1	0
	G	2	2	1	2	1	1	2	0
	N	3	2	2	2	2	1	3	1
	E	-	-	-	-	-	-	1	-
Con-A	P	2	1	1	2	2	1	2	1
	Gr	1	1	0	1	1	1	1	1
	M	1	0	1	1	1	0	0	0
	G	2	2	2	2	2	1	2	1
	N	3	NA	1	2	2	1	2	1
	E	-	-	-	-	1	0	1	-

WGA. *Triticum vulgare*, sWGA. WGA succinilada, Con-A. *Concanavalia ensiformis*. P- neurônios de Purkinje, Gr- neurônios granulares, M- neurônios da camada molecular (células em cesto), N- neurônios de núcleos cerebelares, E- esferóides axonais. ^aAs avaliações são de caráter subjetivo relacionadas com a intensidade de coloração e quantidade de células marcadas comparadas com os controles e numericamente classificadas de 1-4 sendo 1-lesões discretas; 2- lesões leves; 3 lesões moderadas e 4 lesões acentuadas, 0- ausência de alterações histológicas. NA- não analisado. ^b raras células tiveram variável intensidade de marcação. ^b há forte marcação do neurópilo na camada granular do cerebelo. * grupo que consumiu a planta por 93 dias e teve restrição ao consumo por 40 dias.

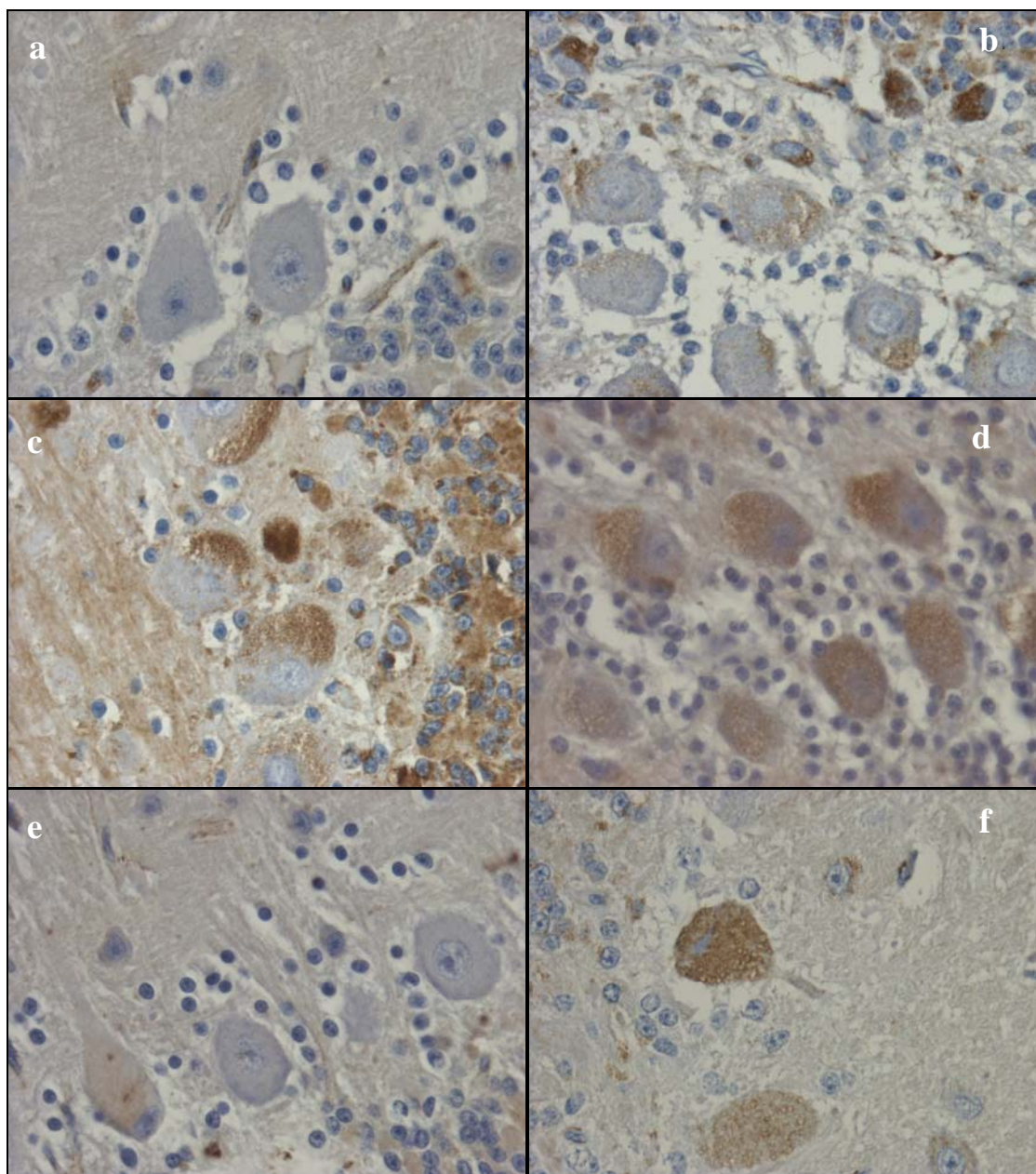


FIGURA 13. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Observação microscópica da marcação de células de Purkinje, em diferentes períodos de consumo de *Sida carpinifolia*, através da histoquímica com a lectina sWGA. O pigmento marron no citoplasma das células indica a ligação desta lectina com o resíduo beta-(1-4)-D-N-acetil-glicosamina. 400x. (a). controle, (b). 15 dias, (c). 40 dias, (d). 93 dias, (e). 40 dias após o consumo durante um período de 93 dias, (f). 105 dias de consumo.

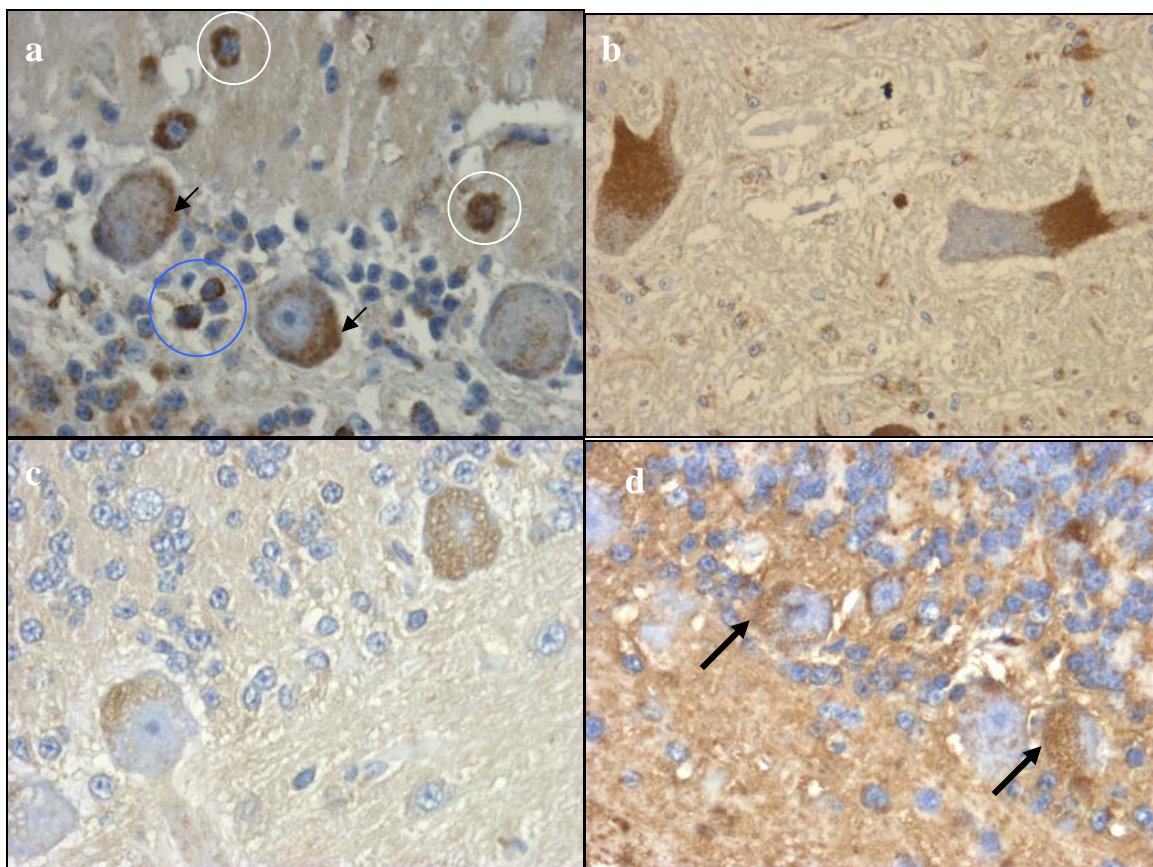


FIGURA 14. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Observação microscópica da marcação de neurônios do cerebelo após o consumo de *Sida carpinifolia* por 105 dias. **(a).** forte marcação com sWGA (*Triticum vulgaris* succinilado) em neurônios de Purkinje (→), em neurônios da camada molecular “células em cesto” (círculo branco) e neurônios granulares (círculo azul), 400x, **(b).** neurônios de núcleo cerebelar com forte marcação pela lectina sWGA, 400x esta marcação, com a cor marron no citoplasma dos neurônios (em a e b), indica a ligação com o resíduo beta-(1-4)-D-N-acetil-glicosamina, **(c).** neurônios de Purkinje marcados pela lectina Con-A (*Concanavalia ensiformis*), 400x,. A marcação marron no citoplasma está associada com a ligação da Con-A com alfa-D-manose e/ou alfa-D-glicose, **(d).** marcação pela WGA (seta), indicando a presença de beta-D-N-acetil-glicosamina, em células de Purkinje, 400x.

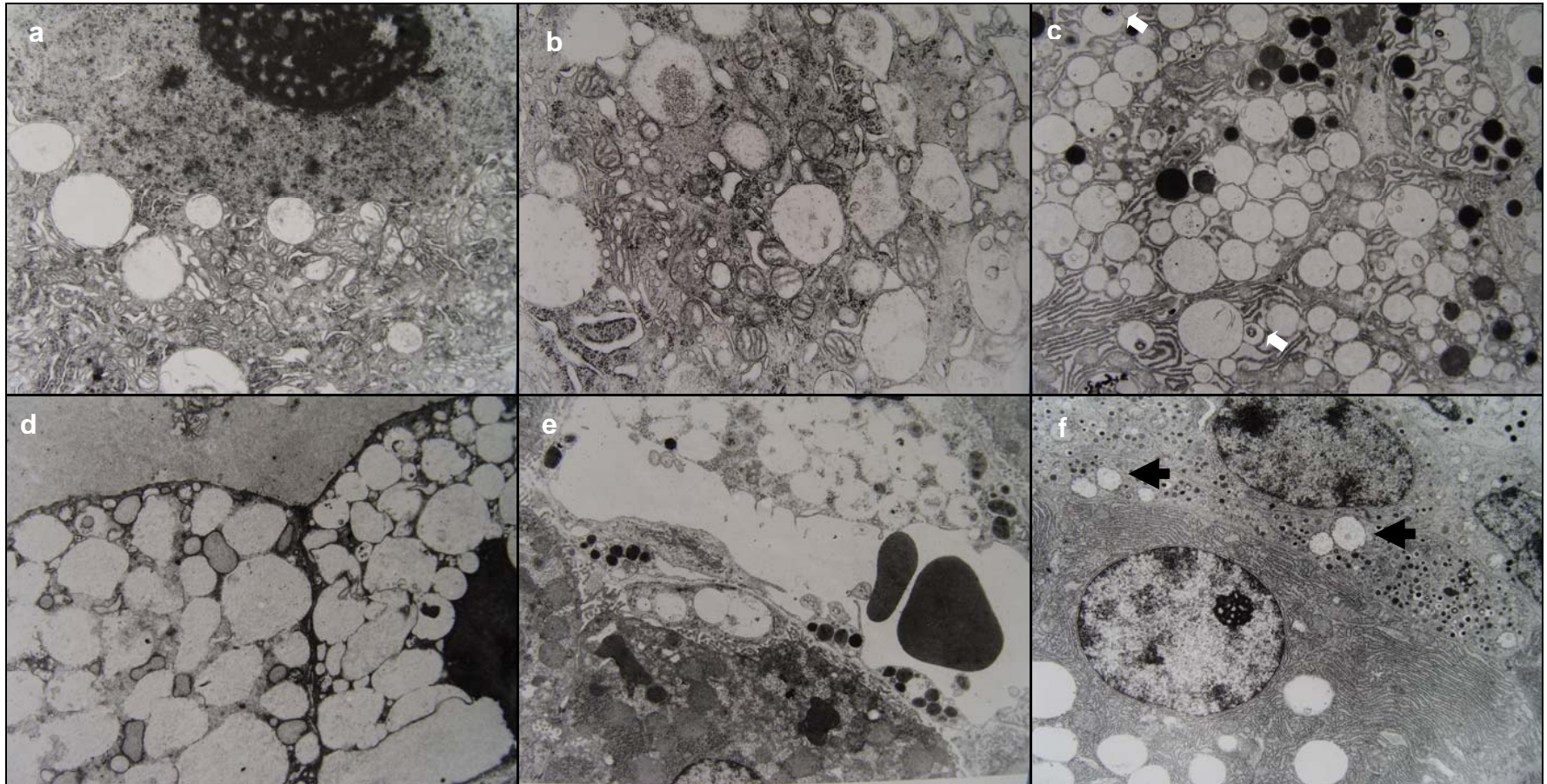


FIGURA 15. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em caprinos. Estudo ultra-estrutural. (a). cerebelo, célula de Purkinje com pericário contendo diversos vacúolos delimitados por membrana, alguns com material finamente granular, 12600x, (b). células de Purkinje com restos de membranas nos vacúolos, 21.600x, (c). pâncreas com células acinares repletas de vacúolos delimitados por membranas, em alguns há grânulos de secreção e outros corpos residuais (seta), 5400x. (d). tireóide com citoplasma de células foliculares com vacúolos e material finamente granular. Há restos celulares na luz dos folículos. 5400x. (e). Fígado, hepatócitos sem alterações, há vacuolização do endotélio. 3000x. (f) pâncreas, vacuolização do epitélio acinar. A célula endócrina não tem vacúolos, há dilatação de mitocôndrias, algumas com cristas encurtadas (seta).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste estudo foi caracterizada a toxidez de *Sida carpinifolia* para caprinos. As observações clínicas e patológicas obtidas pela reprodução experimental corroboram com os resultados publicados sobre a intoxicação espontânea por *Sida carpinifolia* (Driemeier *et al.* 2000; Colodel *et al.* 2002). As alterações clínicas e patológicas são semelhantes às descritas em casos de intoxicação por plantas que contém o alcalóide indolizídínico tri-hidroxilado denominado swainsonina (Dorling *et al.*, 1978; Balogh *et al.*, 1999; James *et al.*, 1981; Armien, 2000). Os trabalhos aqui descritos descrevem e caracterizam pela primeira vez a intoxicação por *Sida carpinifolia* induzindo doença de depósito lisossomal. *Sida carpinifolia* é também a primeira representante da família das Malvaceae da qual foi isolado o alcalóide swainsonina.

O início das alterações clínicas após o consumo de plantas que contém swainsonina varia de 2 até 6 semanas (James *et al.*, 1969, 1971, Dorling *et al.*, 1978, Balogh *et al.*, 1999). Neste estudo há sinais clínicos discretos com

depressão, movimentos lentos e olhar embotado na primeira semana após início do consumo. Os sinais clínicos neurológicos que mais caracterizam a intoxicação por *Sida carpinifolia* foram descritos aos 35±6 dias. Observou-se em um dos surtos durante a investigação da doença natural que os caprinos apresentaram sinais clínicos neurológicos quatro meses após serem introduzidos nos piquetes invadidos com *Sida carpinifolia*. Fatores como desenvolvimento vegetativo e consumo intermitente de *Sida carpinifolia* podem explicar a diferença do período de início dos sinais clínicos na doença espontânea e experimental nos caprinos afetados.

Relatos de emaciação ou perda de peso associadas ao consumo natural e experimental de *locoweeds* são freqüentes (James *et al.*, 1981; Panter *et al.*, 1989; Stegelmeier *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1999). A emaciação foi em parte atribuída diretamente às alterações clínicas neurológicas, pela falta de habilidade na apreensão e mastigação dos alimentos (Ralphs *et al.*, 1990). Especula-se que swainsonina reduz o desempenho corporal dos animais por inibição da mannosidase II, resultando em glicosilação anormal de enzimas pancreáticas (Stegelmeier *et al.*, 1995). Em nosso estudo observou-se perda de peso ou menor desenvolvimento corporal, principalmente em caprinos com menos de um ano de idade. Observamos diferenças de ganho de peso já na primeira semana de consumo, período em que não eram observados sinais clínicos neurológicos nos caprinos experimentais. Nos caprinos necropsiados após 15 dias de consumo de *Sida carpinifolia* havia vacuolização extensiva do epitélio acinar pancreático e

folicular da tireóide, estes achados podem estar relacionados com diminuição do desenvolvimento corporal dos caprinos por alterações na função metabólica.

Um caprino necropsiado, quando apresentava diarreia, tinha vacuolização de plexos mioentéricos, porém, a causa da alteração intermitente na consistência das fezes, usualmente pastosa, não foi esclarecida neste trabalho. Essa alteração clínica não é descrita em intoxicação por outras plantas com o alcalóide swainsonina. Princípio tóxico com efeito espasmódico foi isolado de *Sida carpinifolia* (Prasad & Achari, 1966). Em eqüinos naturalmente intoxicados por *Sida carpinifolia* vacuolização acentuada do plexo celíaco foi associada com impactação colônica (Loretti *et al.*, 2004). Durante as investigações sobre a intoxicação natural por *Sida carpinifolia* em rebanhos no Rio Grande do Sul, proprietários reclamavam com freqüência da ocorrência de diarreia em bovinos logo nos primeiros dias após os animais serem colocados em piquetes invadidos por *Sida carpinifolia*. A doença neurológica, na maioria desses rebanhos de bovinos, não foi relatada. Na intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* em ovinos, alterações de consistência das fezes foram observadas com freqüência na 2ª ou 3ª semana após o início do consumo (Seitz, 2003).

As principais alterações clínicas de distúrbios nervosos, que se manifestaram progressivamente, refletiam principalmente as alterações cerebelares. A função do cerebelo é modular a atividade motora processando informações corticais cerebrais para desencadear e inibir o movimento motor. O axônio da célula de Purkinje é a única fibra eferente do córtex cerebelar, sendo o terminal central para o processamento de informações do córtex cerebelar que são encaminhadas via axonal para os núcleos cerebelares e na seqüência para os

núcleos vestibulares (Burt, 1995; Machado, 1998). Havia incoordenação, dismetria, tremores musculares, balançar de cabeça, instabilidade postural, desequilíbrio, quedas, dificuldade para voltar à estação e posturas atípicas. Estas alterações foram relacionadas neste estudo com a intensidade dos sinais clínicos, com o tempo de ingestão de *Sida carpinifolia* e com a intensidade da vacuolização e distensão do citoplasma especialmente das células de Purkinje do cerebelo. Dados obtidos por Bedin (2004), no HCPA, de amostras obtidas dos caprinos deste experimento, mostram que alteração significativa da atividade da enzima alfa-manosidase em leucócitos e no plasma entre o 4º e 5º dia do início do consumo, retornando aos valores normais entre o 2º e 10º dia após os Caprinos pararem de consumir *Sida carpinifolia*. Na análise da excreção de oligossacarídeos na urina ocorreram alterações no 2º dia após o início do consumo. Os oligossacarídeos não foram mais notados no dia subsequente a retirada em *Sida carpinifolia*. Estes dados demonstram a rápida atividade do alcalóide swainsonina encontrado em *Sida carpinifolia* auxiliando a explicação da ocorrência progressiva de sinais clínicos e lesões histológicas, assim como a rápida recuperação do quadro clínico após os caprinos serem privados do consumo de *Sida carpinifolia*.

Recuperação clínica de caprinos intoxicados por *Sida carpinifolia* como descrito neste trabalho é consistente com os dados da literatura (Huxtable & Dorling, 1982; Balogh *et al.*, 1999). Em caprinos necropsiados vários meses após o consumo da planta não há vacuolização citoplasmática, porém notam-se alterações degenerativas em neurônios de Purkinje, como eosinofilia citoplasmática e picnose nuclear além de marcada perda dessas células indicam a acentuada vulnerabilidade das células de Purkinje ao alcalóide swainsonina (Tirkey *et al.*,

1987). A recuperação clínica pode ser explicada pela uniformidade histológica e funcional do córtex cerebelar, diferentemente do cerebral. Em casos de lesões cerebelares áreas normais assumem progressivamente as funções das em que ocorreu morte celular. Isso não ocorre se a lesão compromete os núcleos cerebelares (Machado, 1998). Este achado é importante para o manejo clínico de rebanhos afetados permitindo sugerir que retirar os caprinos de áreas invadidas por *Sida carpinifolia* é uma medida de prevenção e para recuperação da intoxicação por essa planta. Algumas substâncias como a apomorfina e cloreto de lítio, causam aversão ao consumo de *locoweeds* (Pfister *et al.*, 2002), porém não há estudo sobre uso de substâncias que causem aversão ao consumo de *Sida carpinifolia* em caprinos.

Vacuolização múltipla que confere ao citoplasma um aspecto espumoso, por vezes com tumefação citoplasmática em várias células, foi o achado microscópico de maior relevância neste estudo. Estas alterações são similares às descritas em casos naturais da intoxicação por *Sida carpinifolia* sendo o principal achado em casos de intoxicação por plantas que contém swainsonina (James *et al.*, 1967; 1971; Dorling *et al.*, 1978; Balogh *et al.*, 1999) As lesões também são similares àquelas descritas em casos de alfa-mansidose hereditária de bovinos Angus (Whittem & Walker, 1957; Jolly, 1971) e de seres humanos (Kjellman *et al.*, 1969). O alcalóide swainsonina inibe a atividade principalmente de alfa-mansidase lisossomal e da mansidase II do aparelho de Golgi causando acúmulo de oligossacarídeos nos lisossomos e síntese anormal de glicoproteínas (Dorling *et al.*, 1980; Elbein, 1989), portanto com características bioquímicas da atividade enzimática e excreção de oligossacarídeos diferem da doença hereditária

(Fuhrmann *et al.*, 1985). As variações de intensidade das lesões encontradas em caprinos que consumiram *Sida carpinifolia* por períodos similares podem ser explicadas pela diferença no consumo médio diário e também pelas periódicas diminuições de consumo em casos de sinais clínicos acentuados.

Ultra-estruturalmente, o principal achado é a vacuolização do citoplasma em diferentes grupos de células (Stegelmanier *et al.* 1995). A observação ultra-estrutural de vacúolos em hepatócitos é freqüente. A ausência de vacúolos em hepatócitos dos Caprinos 1 e 2, neste estudo experimental não está esclarecida. Estudos toxicocinéticos revelam que swainsonina varia em concentração nos diferentes tecidos e que as lesões celulares são relacionadas com diferentes concentrações do alcalóide (Stegelmeier *et al.*, 1998, 1999). A concentração tecidual e sérica de swainsonina diminui e a atividade enzimática retorna ao normal rapidamente após a supressão da administração do alcalóide (Tulsiani & Touster, 1983). Esse Grupo de Caprino (Caprino 1 e 2) especialmente nos últimos 3 dias do experimento, associado a sinais clínicos acentuados, tinha dificuldade para ingestão de alimentos. É possível que neste período tenha ocorrido diminuição das lesões em hepatócitos. Histologicamente na hematoxilina e eosina, os hepatócitos, o epitélio tubular renal e enterócitos, mostravam diferentes graus de vacuolização e tumefação, porém de discreta diferenciação com células similares dos Caprinos controles. Esses vacúolos podem ser artefatos de fixação ou processamento do material para o estudo histológico, ou mesmo pela deposição de glicogênio, como ocorre em hepatócitos, portanto o valor desses achados necessita de criteriosa avaliação.

O padrão de coloração com lectinas observado em células de Purkinje é similar ao demonstrado para manose em humanos, bovinos e felinos (Alroy *et al.*, 1985). Após o processamento para análise histológica de tecidos com manose os principais resíduos citoplasmáticos são alfa-manose e resíduos beta-N-acetil-glicosamínicos (Alroy *et al.*, 1985). Em nossos estudos ocorreu forte marcação com a Con-A e WGA e sWGA. A Con-A tem forte especificidade com alfa-manose e a indicação da expressão de beta-N-acetil-glicosamina foi dada pela forte marcação com marcação com sWGA e WGA. Evidenciam-se mais as alterações pelo acúmulo de material em neurônios com o uso da histoquímica com lectinas em relação àquelas notadas com a coloração de HE, sendo que essa diferença é mais evidente com o uso da sWGA.

O uso de colorações especiais como PAS (ácido periódico de Schiff), e Ziehl-Neelsen (ZN), podem auxiliar na identificação da natureza do material armazenado. A coloração PAS indica a presença de carboidratos contendo grupos glicol ou lipídios insaturados retidos no processamento histológico (Warren & Alroy, 2000). Pigmentos contendo lipofuscina são marcados com PAS e ZN (Matsumoto, 2001). Neste trabalho, houve marcação com PAS e ZN em neurônios eosinofílicos, encarquilhados e com núcleos picnóticos, indicando grânulos similares a lipofuscina possivelmente relacionados com a autofagia de organelas prévia a morte neuronal.

Para o diagnóstico diferencial, as doenças que cursam com sinais clínicos de distúrbios nervosos devem ser consideradas. No entanto as doenças clínicas associadas com vacuolização neuronal devem receber atenção especial, devido ao impacto exercido pelas encefalopatias espongiiformes transmissíveis (EET). A scrapie é uma EET reconhecida em ovinos por mais de 250 anos. Em 1942 foi

reconhecido um caso de Scrapie em caprinos e posteriormente casos esporádicos foram relatados (Wood et al., 1992). Recentemente um caso de encefalopatia espongiforme bovina foi relatado em um caprino na França (OIE, 2005). A duração do quadro clínico é de 2 semanas até 7 meses, ocorrendo alterações de comportamento principalmente com respostas exageradas a estímulos externos usuais. As alterações neurológicas principais são emagrecimento e agressividade inicial, posteriormente há hipoquinésia quando o caprino afetado permanece com expressão facial fixa com aspecto embriagado, tem movimentos lentos com incoordenação motora e posturas atípicas. Na fase final há prostração e decúbito permanente. O prurido é uma manifestação constante da doença em caprinos por vezes ocorrendo auto-mutilação (Capucchio et al., 2001). As alterações histológicas das EET estão localizadas na medula oblonga sobre o óbex, mas ocorrem também em menor intensidade em outras áreas incluindo o cerebelo e consiste de vacuolização neuronal e de neurópilo e astrocitose. Normalmente esses vacúolos são únicos ou por vezes múltiplos ocupando todo o pericário neuronal (Capuccio et al., 1998, 2001). Os vacúolos observados em casos de intoxicação por *Sida carpinifolia* apresentam distribuição difusa, ocorrem com grande intensidade em órgãos como tireóide e pâncreas e dão ao citoplasma um aspecto espumoso. Não se observam reação inflamatória em caprinos intoxicados com *Sida carpinifolia*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAMANOLIS, D.P. The pathology of lysosomal storage diseases. **Pathology annual**. v.30, p. 247-285, 1995.
- ALROY, J., ORGAD, U., UCCI, A.A., PEREIRA, M.E. Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 32 n. 12, p. 1280-1284. 1984
- ALROY, J., ORGAD, U., UCCI, A.A., GAVRIS, V.E. Swainsonine toxicosis mimics lectin histochemistry of mannosidosis. **Veterinary Pathology**. v. 22, p. 311-316. 1985.
- ALROY, J., WARREN, C.D., RAGHAVAN, S.S., DANIEL, P.F., SCHUNK, K.L., KOLODNY, E.H. Biochemical, ultrastructural and histochemical studies of cat placentae deficient in activity of lysosomal alpha-mannosidase. **Placenta**. v. 8 n. 5, p. 545-553. 1987.
- APPLEGARTH, D.A., TOONE, J.R., MACLEOD, P.M., Laboratory diagnosis of inborn errors of metabolism in children. **Pediatric Pathology**. v.1 p.107-30. 1983.
- ARMESTO, R.R., REPETTO, A.E., ORTEGA H.H., PERALTA, C.J., PENSIERO, J.F., REF, P.K., SALVETTI, N.R. Intoxicacion en cabras por ingestion de *Ipomoea hieronymi* var. *Calchaquina* en la provincia de Catamarca, Argentina. **Veterinaria Argentina**. v. 21, p. 332-341. 2004.
- ARMIÉN, A.G. Vergleichende klinische und morphologische Untersuchungen zur spontanen und experimentellen Vergiftung durch *Ipomoea fistulosa* (Convolvulaceae) bei Ziegen. **Tese**, Justus-Liebig-Universität Giessen, Alemanha. 212p. 2000.
- BALOGH, K.K.I.M., DIMANDE, A.P., LUGT, J.J., MOLYNEUX, R.J., NAUDÉ, T.W., WELMAN, W.G. A lisosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, pp. 266-273. 1999.

- BARLOW, R.M., MACKELLAR, A., NEWLANDS, G., WISEMAN, A., BERRETT, S. Mannosidosis in Aberdeen Angus cattle in Britain. **Veterinary Record**. v. 109, p. 441-445. 1981.
- BEAUDET, A.L. Disorders of glycoprotein degradation: mannosidosis, fucosidosis, sialosidosis ad aspartylglycosaminuria. In: STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B., FREDRICKSON, D.A.S., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. **The Metabolic Basis of Inherited Diseases**. 5^a. ed. McGraw-Hill: New York, p. 788-802. 1983.
- BEDIN, M. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Genética Médica, **Dados não publicados**, 2004.
- BISCHOFF, J., KORNFELD, R. Evidence for an alpha-mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 258, p.7907-7910. 1983.
- BRAUN, K., ROMERO, J., LIDDELL, C., CREAMER, R. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. **Mycology Research**. v. 107, p. 980-988. 2003.
- BURDITT, L.J., CHOTAI, K., HIRANI, S., NUGENT, P.G., WINCHESTER, B.G., BLAKEMORE, W.F. Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. **Biochemical Journal**. v. 189, p.467-473. 1980.
- BURT, A.M. **Neuroanatomia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1995.
- CAPUCCHIO, M.T., GUARDA, F., ISAIA, M.C., CARACAPPA, S., DI MARCO, V. Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. **Veterinary Record**. v. 143, p. 452-453. 1998
- CAPUCCHIO, M.T., GUARDA, F., POZZATO, N., COPPOLINO, S., CARACAPPA, S., Di MARCO, V. Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 48, p. 23-31. 2001.
- COLEGATE, S.M., DORLING, P.R., HUXTABLE, CR. A spectroscopic investigation of swainsonina: an alfa-mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. **Australian Journal of Chemical**. v.32, p. 2257-2264. 1979.
- 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, p. 51-57. 2002a.
- COLODEL, E.M., GARDNER, D.R., ZLOTOWSKI, P., DRIEMEIER, D. Identification of swainsonina as a glycoase inibidor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**. Vol 44, p.177-178. 2002b.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO BRASIL. **Resolução CFMV nº 714**, de 20 de junho de 2002. 2002.
- CRAWLEY, A.C., JONES, M.Z., BONNING, L.E., FINNIE, J.W., HOPWOOD, J.J., Alpha-mannosidosis in the guinea pig: A new animal model for lysosomal storage disorders. **Pediatric Research**. v. 46, p. 501-509. 1999.

- CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 2^a. ed. Civilização Brasileira: Rio de Janeiro, 599p. 1982.
- DAHL, L.B., KAARESEN, P.I., FUNDINGSRUD, H.P. Children with birth weight 1500 g or under from Troms and Finnmark in the period 1978-1989. **Tidsskrift for den Norske laegeforening**. v. 119, p.180-185. 1999.
- DANIEL, P.F., WARREN, C.D., JAMES, L.F. Swainsonine-induced oligosaccharide excretion in sheep. Time-dependent changes in the oligosaccharide profile. **Biochemistry Journal**. v. 221, p. 601-607. 1984.
- De DUVE, C. - Lysosomes, a New Group of Cytoplasmic Particles. In: Subcellular Particles, HAYASHI, T. The Ronald Press Co. New York, 1959.
- DESNICK, R.J., KRIVIT, W., SHARP, H.L. In utero diagnosis of Sandhoff's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 51, p. 20-24. 1973.
- DICKERSIN, G.R., LOTT, I.T., KOLODNY, E.H., DVORAK, A.M., A light and electron microscopic study of mannosidosis. **Human Pathology**. v. 11. p.245-256. 1980.
- DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R., VOGEL, P. Lysosomal storage in Swainsona spp. toxicosis: an induced mannosidosis. **Neuropathology Applied Neurobiology**. v. 4, p.285-295. 1978.
- DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R., COLEGATE, S.M. Inhibition of lysosomal - mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. **Biochemistry Journal**. v. 191, p. 649-651. 1980.
- DRICKAMER, K., TAYLOR, M.E. Evolving views of protein glycosylation. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 23, p.321-324. 1998.
- 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, p. 153-159. 2000.
- ELBEIN, A.D., SOLF, R., DORLING, P.R., VOSBECK, K. Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 78. 7393-7397. 1981.
- EMBURY, D.H., JERRETT, I.V. Mannosidosis in Galloway calves. **Veterinary Pathology**. v. 22, p. 548-551. 1985.
- FUHRMANN, U., BAUSE, E., PLOEGH, H. Inhibitors of oligosaccharide processing. **Biochemistry and Biophysical Acta**. v. 825, p. 95-110. 1985.
- FUJITA, T., NAGASAWA, H., UTO, Y., HASHIMOTO, T., ASAKAWA, Y., HORI, H. Synthesis of the new mannosidase inhibitors, diversity-oriented 5-substituted swainsonine analogues, via stereoselective Mannich reaction. **Organic Letters**. v.6, p.827-830. 2004.
- GAVA, A., SOUSA, R.S. DEUS, M.S., PILATI, C., CRISTANI, J., MORI, A., NEVES, D.S. *Phalaris angusta* (Gramineae) como causa de enfermidade neurológica em

- bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.19, p.35-38. 1999.
- GOLDSTEIN, I.J., HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. v. 35, p. 127-340. 1978.
- GROSS, V., GEIGER, T., TRAN-THI, T.A., GAUTHIER, F., HEINRICH, P.C. Biosynthesis and secretion of alpha 1-antitrypsin in primary cultures of rat hepatocytes. Characterization of differently glycosylated intracellular and extracellular forms. **European Journal of Biochemistry FEBS**. v.129, p.317-23. 1982.
- HARRIS, C.M., CAMPBELL, B.C., MOLYNEUX, R.J., HARRIS, T.M. Biosynthesis of swainsonine in the diablo locoweed (*Astragalus oxyphysus*). **Tetrahedron Letters**. v. 29 p.4815-4818. 1988.
- HARTLEY, W.J., BAKER, D.C., JAMES, L.F. Comparative pathological aspects of locoweed and *Swainsona* poisoning of livestock. In JAMES, L.F., ELBEIN, A.D., MOLYNEUX R.J., WARREN, C.D. **Swainsonine and Related Glycoside Inhibitor**, Edds Iowa States University Press, Ames, Iowa. pp 50-56.1970.
- HARTMUT, F. **Advances in Lectin Research**. v.1. Springer-Veriang: Berlin, p.70-77. 1991.
- HEALY, P.J., HARPER, P.A., DENNIS, J.A. Phenotypic variation in bovine alpha-mannosidosis. **Research in Veterinary Science**. v. 49, p.82-84. 1990.
- 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 Farmacologia**. v. 70, p. 55-58. 1989.
- HERS HG. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). **Biochemical Journal**. v.86, p.11-16. 1963.
- HUXTABLE, C.R., DORLING, P.R. Animal model of human disease. Mannosidosis. Swainsonine-induced mannosidosis. **American Journal of Pathology**. v. 107, p. 124-126. 1982.
- JAMES, L.F., SHUPE, J.L., BINNS, W., KEELER, R.F. Abortive and teratogenic effects of locoweed on sheep and cattle. **American Journal of Veterinary Research** v. 28, p. 1379-1388. 1967.
- JAMES, L.F., Van KAMPEN, K.R., STAKER, G.R. Locoweed (*Astragalus lentiginosus*) poisoning in cattle and horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.155, p. 525-530. 1969.
- JAMES, L.F., Van KAMPEN, K.R., JOHNSON, A.E. Physiopathologic changes in locoweed poisoning of livestock. **American Journal of Veterinary Research**. v. 31, p. 663-672.1970.

- JAMES LF, VAN KAMPEN KR. Acute and residual lesions of locoweed poisoning in cattle and horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 158, p. 614-8. 1971.
- JAMES L.F., HARTLEY W.J. & VAN-KAMPEN K.R. Syndromes of Astragalus poisoning in livestock. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 178, p. 146-150. 1981.
- JAMES, L.F., PANTER, K.E. Locoweed poison in livestock. In JAMES, L.F., ELBEIN, A.D., MOLYNEUX R.J., WARREN, C.D. **Swainsonine and Related Glycoside Inhibitor**, Edds Iowa States University Press: Ames, Iowa. pp 23-38. 1981.
- JAMES, L.F., NIELSON, D. Locoweeds: assessment of the problem on western U.S. rangelands. In: JAMES, L.F. RALPHS, M.H., NIELSON, D.B. **The Ecology and Economic Impact of Poisonous Plants on Livestock Production.** Westview Press: Boulder, p. 171-180. 1988.
- JOLLY, RD. The pathology of the central nervous system in pseudolipidosis of Angus calves. **Journal of Pathology.** v. 103, p. 113-121. 1971.
- JOLLY, R.D., THOMPSON, K.G., TSE, C.A., MUNFORD, R.E, MERRALL, M. Identification of mannosidosis heterozygotes-factors affecting normal plasma alpha-mannosidase levels. **New Zealand Veterinary Journal.** v. 22, p. 155-162. 1974.
- JOLLY, R.D. Mannosidosis of Angus Cattle: a prototype control program for some genetic diseases. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine.** v. 19 p. 1-21.1975.
- JOLLY, R.D., DODDS, W.J., RUTH, G.R., TRAUNER, D.B. Screening for genetic diseases: principles and practice. JOLLY, R.D. Mannosidosis of Angus Cattle: a prototype control program for some genetic diseases. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine.** v. 25, p. 245-276.1981.
- JOLLY, R.D. Lysosomal storage diseases in livestock. **Veterinary Clinical of North America and Food Animal Practice.** v. 9, p. 41-53. 1993.
- JOLLY, R.D., WALKLEY, S.U. Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. **Veterinary Pathology.** v. 34, p. 527-548.1997.
- KANG MS, ELBEIN AD. Alterations in the structure of the oligosaccharide of vesicular stomatitis virus G protein by swainsonine. **Journal of Virology.** v. 46, p. 60-69. 1983.
- KING, N.W., ALROY, J. Deposições intracelulares e extracelulares; degenerações,. In: JONES T.C., HUNT R.D. & KING N.W. (ed.) **Patologia Veterinária.** 6^a ed. Manole: São Paulo. p. 27-59. 2000.
- KINGSBURY J.M. **Poisonous Plants of the United States and Canada.** Prentice-Hall: Englewood Cliffs, NJ, p. 206-208. 1964.

- 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 p. 696-698. 1978.
- KISSMANN, K.G., GROTH, D. *Sida carpinifolia* L.f. In: **Plantas infestantes e Nocivas**. Tomo III, p. 131-134. BASF, São Paulo, Brasil, 1995.
- KJELLMAN, B., GAMSTORP, I., BRUN, A., OCKERMAN, P.A., PALMGREN, B. Mannosidosis: a clinical and histopathologic study. **Journal Pediatric** v. 75, p. 366-373. 1969.
- KORNFELD, S., REITMAN, M.L., VARKI, A., GOLDBERG, D., GABEL, C.A. Steps in the phosphorylation of the high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes. **Ciba Foundation Symposium**. n. 92, p. 138-156. 1982.
- LAWS, L., ANSON, R.B. Neuronopathy in sheep fed *Swainsona luteola* and *S. galegifolia*. **Australian Veterinary Journal**. v.44, p. 447-452. 1968.
- LEIPOLD, H.W., SMITH, J.E., JOLLY R.D., ELDRIDGE, F.E. Mannosidosis of Angus calves. **Journal of America Veterinary Medicine Association**. v. 175, p. 457-459. 1979.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais**. 5ª ed. Plantarum Ltda, Nova Odessa, SP, p. 471-478. 2000.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemistry Revision**. v. 98, p. 637-674. 1998.
- 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**. v. 35: 434-438. 2004.
- LUTZENBERGER, L.C. Revisão da nomenclatura e observações sobre as Angiospermas citadas na obra de Manuel Cypriano D'Avila: "Da Flora Medicinal do Rio Grande do Sul". Porto Alegre, Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da UFRGS, **Dissertação**. 1985.
- LUZI, P., VICTORIA, T., RAFI, M.A., WENGER, D.A., Analysis of the 5' flanking region of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. **Biochemical and Molecular medicine**. v. 62, p. 159-164. 1997.
- MAXFIELD, F.R., MUKHORJEE, S. The endosomal-lysosomal system. In: PLATT, F.M., WALKLEY, S.U. **Lysosomal Disorders of the Brain**. Oxford University Press: Oxford p. 3-31. 2004
- MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2ª ed. Atheneu: Rio de Janeiro, RJ. 380p. 1999.
- MAENHOUT, T., KINT, J.A., DACREMONT, G., DUCATELLE, R., LEROY, J.G., HOORENS, J.K. Mannosidosis in a litter of Persian cats. **Veterinary Record**. v. 122, p. 351-354. 1988.

- MEIKLE, P.J., HOPWOOD, J.J., CLAGUE, A.E., CAREY, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. **The Journal of the American Medical Association**. v. 281, p. 249-254. 1999.
- MATSUMOTO Y. Lipofuscin pigmentation in pleomorphic adenoma of the palate. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**. v.92, p.299-302. 2001.
- MOLYNEUX, R.J., JAMES, L.F. Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Science**. v. 216 p. 190-191. 1982.
- MOLYNEUX, R.J., MCKENZIE, R.A., O'SULLIVAN, B.M., ELBEIN, A.D. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. *calobra*]) and correlation with toxicity. **Journal of Natural Products**. v. 58, p.878-886. 1995.
- MONSIGNY, M., ROCHE, A.C., SENE, C., MARGET-DOMMA, R., DELMOTTE, F. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates?. **European Journal of Biochemistry**. v. 104, p.147. 1980.
- MUNTZ, F.H., BONNING, L.E., CAREY, W.F. Alpha-mannosidosis in a guinea pig. **Laboratory Animal Science**. v. 49, p. 424-6. 1999.
- NOVIKOFF, P.M., TOUSTER, O., NOVIKOFF, A.B., TULSIANI, D.P. Effects of swainsonine on rat liver and kidney: biochemical and morphological studies. **The Journal of Cell Biology**. v. 101, p. 339-349. 1985.
- OCKERMAN, P.A. Deficiency of beta-galactosidase and alpha-mannosidase--primary enzyme defects in gargoylism and a new generalized disease? **Acta paediatrica Scandinavica. Supplement**. v. 177, p. 35-6. 1967.
- OIE, World Organisation for animal health. Bovine spongiform encephalopathy in a goat in France. **Press releases/Editorials**. Disponível em <http://www.oie.int/eng/press/en_050201b.htm> atualizado em 01 de fevereiro de 2005.
- PANTER, K.E., JAMES, L.F., HARTLEY, W.J. Transient testicular degeneration in rams fed locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Veterinary and Human Toxicology**. v. 31, p. 42-46. 1989.
- PAULOVICH, F.B., PORTIANSKY, E.L., GIMENO, E.J., SCHILD, A.L., MENDEZ, M.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. 473-7. 2002.
- PEARSON, W.H., HEMBRE, E.J. A Practical Synthesis of (-)-Swainsonine. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 61, p.7217-7221. 1996.
- PFISTER, J.A., STEGELMEIER, B.L., CHENEY, C.D., JAMES, L.F., MOLYNEUX, R.J. Operant analysis of chronic locoweed intoxication in sheep. **Journal of Animal Science**. v. 74, p. 2622-2632. 1996.

- PFISTER, J.A., STEGELMEIER, B.L., CHENEY, C.D., RALPHS, M.H., GARDNER, D.R. Conditioning taste aversions to locoweed (*Oxytropis sericea*) in horses. **Journal of Animal Science**. v. 80, p. 79-83. 2002.
- PIENAAR, J.G., KELLERMAN, T.S., BASSON, P.A., JENKINS, W.L., VAHRMEJER, J. Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N.E. Br. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 43, p. 67-74. 1976.
- PLATT, F.M., WALKLEY, S.U. Lysosomal defects and storage. In: **Lysosomal Disorders of the Brain: Recent Advances in Molecular and Cellular Pathogenesis and Treatment**. Oxford University Press, New York. p. 32-49. 2004.
- PRASAD, D.N., ACHARI, G. Acetylcholine-like activity in *Sida carpinifolia*. **The Indian Journal of Pharmacy**. v. 28, p. 241-244. 1966.
- PRITCHARD, D.H., HUXTABLE, C.R., DORLING, P.R. Swainsonine toxicosis suppresses appetite and retards growth in weanling rats. **Research in Veterinary Science**. v. 48, p. 228-230. 1990.
- PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. 1 ed. Armed Forces Institute of Pathology, Washington. 279p. 1992.
- RALPHS, M.H., JAMES, L.F. Locoweed grazing. **Journal of Natural Toxins**. v. 8, p. 47-51. 1999.
- RALPHS, M.H., PANTER, K.E., JAMES, L.F. Feed preferences and habituation of sheep poisoned by locoweed. **Journal of Animal Science**. v. 68:1354-1362. 1990.
- RICHARDS, J.B., HALLFORD, D.M., DUFF, G.C. Serum luteinizing hormone, testosterone, and thyroxine and growth responses of ram lambs fed locoweed (*Oxytropis sericea*) and treated with vitamin E/selenium. **Theriogenology**. v. 52, 1055-1066. 1999.
- RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas que afetam o sistema nervoso central In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C., SCHILD, A.L. **Intoxicações por Plantas e Micotoxícoses em Animais Domésticos**. Hemisfério Sul do Brasil, Pelotas, RS, p. 113-158. 1993.
- ROBLES, C.A., SABER, C., JEFREY, M. intoxicación por *Astragalus pehuenches* (locoweed). **Revista de Medicina Veterinaria**. v. 81, p. 380-384. 2000.
- SCHNEIDER, M.J., UNGEMACH, F.S., BROQUIST, H.P., HARRIS, T.M. **Tetrahedron**. v. 39, p. 29-32. 1983.
- SEITZ, A.L. Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 62p. 2003.

- SOUSA, R.S., IRIGOYEN, L.F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.19, p.116-122. 1999.
- STEGELMEIER, B.L., MOLYNEUX, R.J., ELBEIN, A.D., JAMES, L.F. The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. **Veterinary Pathology**. v. 32, p. 289-298. 1995.
- STEGELMEIER, B.L., JAMES, L.F., PANTER, K.E., GARDNER, D.R., RALPHS, M.H., PFISTER, J.A. Tissue swainsonine clearance in sheep chronically poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). **Journal of Animal Science**. v. 76, p.1140-1144. 1998.
- STEGELMEIER, B.L., 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**. 11:448-456. 1999.
- SUAMI, T., KINICHI, T., YOICHI, I. **Chemistry Letters**. v. 4, P. 513-516. 1984.
- SUMMERS, B.A., CUMMINGS, J.F., DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. Mosby St. Louis, MO. p 208-350. 1995.
- TAMERLER C, ULLAH M, ADLARD MW, KESHAVARZ T. Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. **FEMS Microbiology Letters**. v.168, p. 17-23. 1998.
- TAYLOR, M.E., DRICKAMER, K. **Introduction to Glycobiology**. Oxford University Press: Oxford. 207 p. 2003.
- TIRKEY, K., YADAVA, K.P., MANDAL, T.K. Effect of aqueous extract of *Ipomoea carnea* on the haematological and biochemical parameters in goats. **Indian Journal Animal Science**. v. 57, p. 1019-1023. 1987.
- TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 310 p. 2000.
- TULSIANI, D.R., HARRIS, T.M., TOUSTER, O. Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 257, p.7936-7939. 1982.
- TULSIANI, D.R., TOUSTER, O. Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal alpha-D-mannosidase, decreases Golgi alpha-D-mannosidase II, and increases the plasma levels of several acid hydrolases. **Archives of biochemistry and biophysics**. v. 224, p. 594-600. 1983.
- Van KAMPEN, K.R., JAMES, L.F. Pathology of locoweed poisoning in sheep. **Veterinary Pathology**. v. 6, p. 413-423. 1969.
- Van KAMPEN, K.R., JAMES, L.F. Ovarian and placental lesions in sheep from ingesting locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Veterinary Pathology**. v. 8, p. 193-199. 1971.

- Van KAMPEN, K.R., JAMES, L.F. Sequential development of the lesions in locoweed poisoning. **Clinical Toxicology**. v. 5, p.575-580. 1972.
- WANG, S., PANTER, K.E., HOLYOAK, G.R., MOLYNEUX R.J., LIU, G., EVANS R.C., BUNCH T.D. Development and viability of bovine preplacentation embryos treated with swainsonine in vitro. **Animal reproduction science**. v. 56, p. 19-29. 1999.
- WARREN, C.D., ALROY, J. Morphological, biochemical and molecular biology approaches for the diagnosis of lysosomal storage diseases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. Nov;12(6):483-96. 2000.
- QHITTEM, J.H., WALKER, D. Neuronopathy and pseudolipidosis in Aberdeen Angus calves. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 74, p. 281-288. 1957.
- WINCHESTER, B. Role of alpha-D-mannosidases in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins. **Biochemical Society transactions**. Jun;12(3):522-4. 1984.
- WOOD, J.N., DONE, S.H., PRITCHARD, G.C., WOOLDRIDGE, M.J. Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs. **Veterinary Record**. v. 131, p. 66-68. 1992.

ARTIGO 1

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, p. 53-159. 2000

ARTIGO 2

Colodel, E.M., Driemeier, D., Loretto, A.L., 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, no.2, p.51-57. 2002

ARTIGO 3

Colodel, E.M., Gardner, D.R., Zlotowski, P., Driemeier, D. Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*. v. 44, p. 177-178. 2002.