

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

ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INTOXICAÇÃO POR SELÊNIO EM
SUÍNOS

DANILO CARLOTO GOMES

Porto Alegre
2012

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

ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INTOXICAÇÃO POR SELÊNIO EM
SUÍNOS

Autor: Danilo Carloto Gomes.

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE
2012

CIP - Catalogação na Publicação

Carloto Gomes, Danilo
Aspectos Clínicos e Patológicos da Intoxicação por
Selênio em Suínos / Danilo Carloto Gomes. -- 2012.
64 f.

Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2012.

1. Intoxicação por selênio em suínos. 2.
Poliomielomalácia simétrica focal em suínos. 3. Doença
de suínos. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

DANILO CARLOTO GOMES

ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INTOXICAÇÃO POR SELÊNIO EM SUÍNOS

Aprovada em 29 de fevereiro de 2012.

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Aldo Gava
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estêvão Farias Cruz
Membro da Comissão

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar e me proporcionar essa vida.

Aos meus pais José Alberto e Eliane por todo amor, apoio, educação e conselhos.

Ao meu irmão, meu melhor amigo, mesmo estando cada vez mais longe, o carinho e o amor que sinto por ti é cada vez maior.

A minha namorada Suelle por todo amor, carinho, apoio em todos os momentos.

A todos que participaram da minha educação, em especial aos professores Flademir Wouters e Mary Suzan Varaschin, por me apresentarem a patologia e dividirem seus conhecimentos.

Ao meu orientador David Driemeier, por toda confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e exemplo de profissional.

A todos colegas do SPV, Saulo, Gregory, Paulo, Dedé, Marcele, Fabi, Nadia, Eduardo, Angélica, Juliano, Renata, Luiz, Gabriel, Felipe, Matheus, Neusa, Veronica, Pili, Gisele, Suyene, Tati, Priscila, Mari, Dani, Cris, muito obrigado pela ajuda, pela amizade, pelos momentos de descontração e trabalho.

Aos colegas que passaram pelo SPV Djeison, Luciana, Adriana, Pedroso, muito obrigado por dividirem seus conhecimentos.

Obrigado aos funcionários do SPV Bárbara e Laura pela ajuda com as lâminas e imuno-histoquímicas.

A todos que participaram diretamente e indiretamente na minha formação e conquistas obtidas até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Histórico	12
2.2 Epidemiologia	12
2.3 Patogenia	13
2.4 Sinais clínicos	14
2.5 Achados de necropsia e histopatológicos	15
2.6 Diagnóstico e diagnóstico diferencial	17
2.7 Controle e profilaxia	18
2.8 Intoxicação em outras espécies	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Surto 1	20
3.2 Surto 2	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Surto 1	23
4.2 Surto 2	39
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suínos 2 e 3 com 7 dias de creche (34 dias), apresentavam dificuldade de locomoção e paralisia de membros pélvicos.24
- Figura 2** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suínos com 14 dias de creche (41 dias), com paralisia dos membros pélvicos. Observar animais com membros afastados ou “posição de cão sentado”.25
- Figura 3** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Corte transversal da medula espinhal em intumescência cervical com área circular discretamente amarelada no corno ventral do H medular.....26
- Figura 4** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 4. Linha avermelhada na borda coronária do casco do membro torácico direito.26
- Figura 5** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Desprendimento do casco na borda coronária.....27
- Figura 6** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 7. Intumescência lombar. Microcavitações, perda neuronal, microgliose e proliferação de células endoteliais no corno ventral do H medular. Hematoxilina eosina (HE), Obj 10.....28
- Figura 7** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 6. Intumescência lombar. Neurônio aumentado de volume, contorno citoplasmático levemente arredondado e substância de Nissl dispersa na periferia (Cromatólise periférica). Hematoxilina eosina, Obj. 40.....28
- Figura 8** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 6. Intumescência lombar. Neurônio (seta) aumentado de tamanho, substância de Nissl e núcleo ausentes. Hematoxilina eosina, Obj. 20.29
- Figura 9** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 4. Intumescência lombar com neurônios diminuídos de tamanho, citoplasma levemente eosinofílico e homogêneo (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40x.29
- Figura 10** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 3. Intumescência cervical, neurônio com citoplasma levemente eosinofílico e núcleo picnótico, circundado por células da glia e macrófagos (neuronofagia). Hematoxilina eosina, Obj. 40x.....30
- Figura 11** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Intumescência cervical com infiltrado acentuado de macrófagos com citoplasma vacuolizado (Células Gitter). Hematoxilina eosina (HE), Obj 40.....31
- Figura 12** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Intumescência cervical com infiltrado acentuado de macrófagos (Células Gitter) com citoplasma corados na coloração de Ácido Periódico de Schiff, Obj 40.....31
- Figura 13** – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Intumescência lombar. Evidenciação da proliferação de vasos no corno ventral do H medular pela imunohistoquímica de von Willebrand. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), Obj. 10.....32

Figura 14 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Marcação positiva em astrócitos e seus prolongamentos. Imuno-histoquímica para Proteína Ácida Glial Fibrilar. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), Obj. 20.....	33
Figura 15 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinal, astrócitos gemistocíticos com citoplasma abundante, eosinofílico e núcleo excêntrico (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40.....	33
Figura 16 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinal; astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa com nucléolos proeminentes. Hematoxilina eosina, Obj. 40.	34
Figura 17 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinal, astrócitos tumefeitos marcados na imuno-histoquímica para proteína S-100 (setas). Método estreptavidina-biotina, cromógeno VECTOR [®] NovaRED, Obj. 40.	34
Figura 18 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinal, astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa com nucléolos proeminentes não marcados na imuno-histoquímica para GFAP (setas). Método estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), Obj. 40.....	35
Figura 19 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Tronco encefálico (ponte); ponte, formação reticular com vacuolização e microgliose. Hematoxilina eosina, Obj. 10.....	35
Figura 20 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinal com degeneração walleriana. Hematoxilina eosina, Obj. 10.....	36
Figura 21 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinal, estruturas eosinofílicas, ovais ou circulares (esferoides axonais) (Setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40.....	36
Figura 22 – Intoxicação por selênio. Suíno do surto 2. 23 dias após a ingestão de ração com excesso de selênio. Borda coronária avermelhada no casco do membro torácico..	40
Figura 23 – Intoxicação por selênio. Suíno do surto 2. 23 dias após a ingestão de ração com excesso de selênio. Há linha escura na borda coronária dos cascos.	40
Figura 24 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Áreas circulares amareladas de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro no corno ventral do H medular.	41
Figura 25 – Intoxicação por Selênio. Surto 2. Suíno 9. Áreas circulares esbranquiçadas de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro no corno ventral do H medular.	42
Figura 26 – Intoxicação por Selênio. Surto 2. Suíno 14. Após 44 dias da ingestão de ração com excesso de selênio, demonstrando área escura na extremidade nos cascos...	42
Figura 27 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 9. Intumescência lombar com vacuolização do neurópilo (microcavitações), proliferação endotelial, microgliose e congestão. Hematoxilina eosina, Obj. 10x.....	43
Figura 28 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 10. Intumescência lombar, neurônio com aumento de volume e arredondamento do citoplasma, substância de Nissl dispersa	

da periferia para o centro (Cromatólise periférica) e alguns neurônios retraídos com citoplasma levemente eosinofílico (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 10x.....44

Figura 29 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, neurônio com desaparecimento total da substância de Nissl. Hematoxilina eosina, Obj. 40. 44

Figura 30 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, neurônios com citoplasma eosinofílico homogêneo, fragmentado com células da glia e células Gitter. Hematoxilina eosina, Obj. 20. 45

Figura 31 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, neurônio aumentado de tamanho, citoplasma eosinofílico com vacuolização fina. Hematoxilina eosina, Obj. 40. 45

Figura 32 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, foco de infiltrado de eosinófilos. Astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa (Astrócitos de Alzheimer tipo II) (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40..... 47

Figura 33 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 9. Intumescência cervical, com marcação positiva para imuno-histoquímica de von Willebrand. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina, Obj. 20..... 47

Figura 34 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 10. Intumescência lombar Astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa (Astrócitos de Alzheimer tipo II) (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40. 48

Figura 35 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 10. Intumescência lombar, astrócitos tumefeitos, não marcados na imuno-histoquímica para GFAP. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina, Obj. 40..... 48

Figura 36 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência cervical, astrócitos tumefeitos, marcados na imuno-histoquímica para proteína S-100. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno VECTOR[®]NovaRED, Obj. 40. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Intoxicação por Selênio. Surto 1. Distribuição e intensidade das lesões histológicas no sistema nervoso central.....	37
Tabela 2 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Distribuição das marcações imunohistoquímicas.	38
Tabela 3 – Intoxicação por Selênio. Surto 1. Dosagem de selênio em amostras de fígado refrigerado.....	38
Tabela 4 – Intoxicação por Selênio. Surto 2. Distribuição e intensidade das lesões histológicas e na intumescência cervical da medula espinhal especificamente.....	50
Tabela 5 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Distribuição das marcações imunohistoquímicas.	51
Tabela 6 – Dosagem de selênio em amostras frescas de fígado e ração dos animais do surto 2.....	51
Tabela 7 – Dosagem de selênio em mg/kg nas amostras frescas de fígado, rim, coração, intestino, músculos do pernil, paleta e lombo, dos suínos intoxicados (suínos 12, 31, 14 e 15) e controle (suínos 16 e 17) em mg de Se/ kg.	51

RESUMO

Dois surtos de intoxicação por selênio em suínos que ocorreram no estado do Paraná são descritos. Foram acometidos leitões em fase de creche, 16 de um lote de 100 com 27 dias de idade (surto 1) e 350 de 2285 com 22 dias de idade (surto2) apresentaram poliomielomalácia simétrica focal. Animais que sobreviveram aos surtos desenvolveram lesões de casco características de intoxicação crônica por selênio. Os sinais clínicos iniciaram após 6 dias e 30 horas da introdução da ração com alto teor de selênio nos surtos 1 e 2, respectivamente. O surgimento dos sinais foi abrupto, os animais começavam com andar cambaleante, evoluíam para paralisia dos membros pélvicos e progrediam para paralisia dos membros torácicos e tetraparesia. Os animais do surto 1 não tinham alterações de comportamento e mantinham estado de alerta e animais do surto 2 apresentaram quadros de depressão. Macroscopicamente, observaram-se focos circulares amarelados com áreas deprimidas mais escura, em alguns animais, restritas ao corno ventral da substância cinzenta (H medular) em intumescências cervical e lombar. Microscopicamente, essas áreas corresponderam à malácia da substância cinzenta, caracterizada por microcavitações, perda neuronal, cromatólise, neuronofagia, infiltrado de células Gitter, microgliose, astrócitos de Alzheimer tipo II e proliferação de células endoteliais evidenciadas na imuno-histoquímica (IHQ) para fator de von Willebrand. No segundo surto, dois animais apresentaram vacuolização difusa do citoplasma de neurônios. Em um animal, Astrócitos gemistocíticos foram observados. Na IHQ para Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP), obteve-se marcação positiva na maioria dos animais e, na IHQ para Proteína S-100, obteve-se marcação em alguns casos. Além dessas alterações medulares, foram encontrados, em dois animais lesões de polioencefalomalácia em porções do tronco encefálico. Fragmentos de fígado de oito animais e ração de ambos os surtos foram encaminhados para dosagem de selênio. Em amostras de ração, detectou-se 3,38 ppm (surto 1) e 154 ppm (surto 2) e em amostras de fígado teve dosagens superiores a 3,34 ppm. No surto 2, foi realizada uma visita onde seis suínos foram eutanasiados para monitoramento de níveis hepáticos de selênio, sendo dois animais controles e quatro sobreviventes do surto. Quarenta e dois dias após a retirada da ração, os níveis de selênio foram inferiores ao controle e ao nível considerado em quadros de intoxicação (3 ppm).

Palavras chaves: Intoxicação por selênio, suínos, poliomielomalácia simétrica focal.

ABSTRACT

Two outbreaks of selenium poisoning occurred in pigs in Cruzeiro do Iguaçú and Dois Vizinhos, both of the located in Paraná State. The affected pigs were in the post-weaning period, 16 out of 100 were 27 days of age (outbreak 1) and 350 out of 2285 were 22 days of age (outbreak 2). Affected animals showed signs of focal symmetrical poliomyelomalacia. Surviving pigs developed lesions in hoof, which are characteristic of chronic poisoning by selenium. Clinical signs were observed 6 days and 30 hours after the introduction of the feed with high selenium content in outbreaks 1 and 2, respectively. The appearance of the signs was abrupt, beginning with gait and progressing to paralysis of rear limbs and the forelimbs, or tetraparesis. Animals of outbreak 1 were alert and had no behaviors changes and animals of outbreak 2 showed depression. Macroscopically, in some animals there were yellow circular focus with dark areas, restricted to the ventral horn of the gray matter of spinal cord in cervical and lumbar intumescence. Microscopically, these areas corresponded to gray substance malacia characterized by microcavitation, neuronal loss, chromatolysis, Gitter cell infiltrate, neuronophagia, microgliosis, Alzheimer type II astrocytes and proliferation of endothelial cells, which were labeled by immunohistochemistry (IHC) for von Willebrand factor. In the second outbreak, two animals showed a diffuse cytoplasm vacuolization of the neurons. Gemistocytic astrocytes were observed in one animal. In most affected pigs, positive in test for glial fibrillary acid protein (GFAP) was observed, but only in some cases, there was positive anti-S-100 IHC. In addition these spinal cord changes were seen polioencephalomalacia in portions of the brainstem in two animals. Liver samples from eight animals and feed samples from both outbreaks were referred to determine selenium concentration. Selenium dosages in feed samples were 3.38 ppm (outbreak 1) and 154 ppm (outbreak 2) and in liver samples were above 3.34 ppm. Additions six animals were euthanized for monitoring hepatic levels of selenium, two were control animals and four were survivors of the second outbreak. 42 days after the withdrawal of the diet, selenium levels were lower than in internal control and the level seen in intoxication outbreaks (3 ppm).

Keywords: Selenium poisoning, swine, focal symmetrical poliomyelomalacia

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um microelemento essencial usado nas rações animais (MORENO; SOBESTIANSKY; MÓRES, 2007). Pode ser encontrado em rochas, arenitos, carvão, solo, água de superfície e vegetação (FAN; KIZER 1990). Após vários relatos de surtos de intoxicação, na década de 1960, é que foram descobertos os efeitos benéficos capazes de reduzir a peroxidação das membranas (OLIVEIRA et al., 2007). Com isso, o selênio passou a ser incluído em suplementos minerais, aumentando os riscos de intoxicação para os animais e o homem, uma vez que há uma pequena diferença entre as doses terapêuticas e tóxicas (OLIVEIRA et al., 2007). Intoxicações podem ocorrer pelo uso excessivo de selênio em rações ou misturas (MORENO; SOBESTIANSKY; MÓRES, 2007).

Na intoxicação por selênio em suínos são descritas três apresentações clínicas distintas, dificuldade locomotoras com paresia dos membros e tetraparesia resultantes de poliomiomalácia simétrica focal (WILSON; SHOLZ; DRAKE, 1983; CARSON, 2006); lesões de pele e separação da borda coronária dos cascos (MAHAN; MOXON, 1984; BANHOLZER, HEINRTZI, 1998; SAUVAGEAU, 1998); e perdas reprodutivas caracterizadas por diminuição da concepção e natimortos (CARSON, 2006).

Este trabalho relata a ocorrência de surtos de intoxicação por selênio em suínos no estado do Paraná e enfatiza as alterações clínicas, patológicas e imuno-histoquímicas da Poliomiomalácia Simétrica Focal em Suínos (PSFS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A selenose em suínos foi descrita, inicialmente, como quadros de perda de pelos, rachaduras nos cascos e interrupção da borda coronária dos cascos (MOXON, 1937). A PSFS foi, primeiramente, descrita em meados de 1950, porém tinha etiologia indeterminada (WILSON et al., 1988). A primeira possível relação da PSFS com a intoxicação por selênio foi descrita por Wilson & Drake (1982) e confirmada em 1983, pelo mesmo grupo, através de dosagem de selênio em amostras de fígado, rim, cérebro e sangue total, além da reprodução experimental da doença (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983). Nesse mesmo ano, um grupo de pesquisadores da Geórgia - EUA também correlacionou quadros de paralisia por intoxicação por selênio devido à lesão de poliomielomalácia simétrica focal em suínos (HARRISON et al., 1983). Surgiram descrições de diversos casos naturais da intoxicação por selênio em suínos (CASTEEL et al., 1985; SANFORD, 1990; STOWE et al. 1992; SCHULTZ; HOFFMANN, 1995; PENRITH; ROBINSON, 1996; BANHOLZER; HEINRITZI, 1998; SAUVAGEAU, 1998; DAVIDSON-YORK et al., 1999; CASTEIGNAU et al., 2006; NATHUES et al., 2010; COSTA et al. 2011), além de experimentais (MAHAN; MOXON, 1984; WILSON et al., 1988; WILSON et al. 1989; PANTER et al., 1996; KIM; MAHAN, 2001a). Entre as dificuldades com os ensaios experimentais ressalta-se a relutância dos animais em consumirem rações com altos níveis de selênio (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; MAHAN; MOXON, 1984). Além das lesões de pele, casco e a poliomielomalácia, perdas reprodutivas em suínos foram correlacionadas a dietas com excesso de selênio (CARSON, 2006). Há poucos relatos da doença no Brasil, até então descrita somente por Costa et al. (2011).

2.2 Epidemiologia

O selênio é usado como aditivo na dieta de animais e quadros de intoxicação ocorrem por ingestão excessiva do elemento que decorre de erros na formulação ou homogeneização de rações, pesagem errada do premix (SCHULTZ; HOFFMANN, 1995), utilização de aditivos com níveis elevados de selênio (MORENO;

SOBESTIANSKY; MÓRES, 2007. A doença ocorre, principalmente, em suínos jovens, entre 1e 5 meses de idade. Nesses animais a lesão tem apresentação súbita de tetraparesia por lesão em neurônio motor inferior (DE LAHUNTA, 2009). Pode acometer animais de ambos os sexos (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995), mas os de brancos são mais sensíveis do que os vermelhos ou pretos (KIM; MAHAN, 2001b). A prevalência da doença é bem variada, podendo acometer todos os animais de um lote. Suínos na fase de crescimento são mais sensíveis que os de terminação (NATHUES et al., 2010).

2.3 Patogenia

A patogenia da doença ainda não está bem esclarecida e é possível que mais de um mecanismo esteja envolvido (OLIVEIRA et al., 2007). Acredita-se que o selênio causa deficiência de niacina (WILSON et al., 1988), pois ambos os elementos são eliminados pela mesma rota de metilação, via S-adenosilmetionina (SAM). Dessa forma, o aumento da eliminação do selênio levaria a um aumento das enzimas e da eliminação da nicotinamida (WILSON et al., 1989), que é uma forma amida da niacina, cujos derivados desempenham funções no metabolismo energético (NELSON; COX, 2006). Essa desordem metabólica, inicialmente, é tóxica para os astrócitos, com posterior degeneração neuronal (DE LAHUNTA, 2009). Essa teoria se baseia na similaridade das lesões histológicas causadas pela intoxicação por selênio e a aplicação intraperitoneal de um antagonista da nicotinamida (6-amino nicotimamida) levando à deficiência de niacina (O'SULLIVAN; BLAKEMORE, 1980; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; ZACHARY, 2009). A administração desse fármaco causa vacuolização difusa em bainhas de mielina, alteração essa não observada em casos de intoxicação por selênio (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995). A suplementação de niacina em casos de intoxicação experimental por selênio pode retardar o aparecimento dos sinais clínicos, entretanto, não previne a morte do animal ou a elevação de níveis de selênio nas análises de amostras de fígado e rim (WILSON et al., 1989). Em uma reprodução experimental de intoxicação por selênio dosou-se a quantidade de niacina em sangue, soro, cérebro, rim e fígado e não foi notada diferença entre o grupo controle e os grupos intoxicados, porém o autor concluiu que seus dados eram limitados (WILSON et al., 1988).

Outra hipótese é que o edema resultante de alterações vasculares que incluem proliferação endotelial, degeneração fibrinoide da parede dos vasos e infiltrado perivascular de linfócitos, desempenham importante papel no desenvolvimento da malácia (PENRITH; ROBINSON, 1996; NÉSPOLI et al., 2001).

A patogenia das lesões de pele e anexos na intoxicação por selênio não é conhecida, mas possivelmente ocorra mudança na composição da queratina por uma substituição do enxofre pelo selênio nos aminoácidos sulfurados (GINN; MANSELL; RAKICH, 2007).

2.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos variam com a quantidade de selênio ingerida pelo animal (MORENO; SOBESTIANSKY; MÓRES, 2007). O surgimento dos sinais clínicos varia de um dia (PENRITH; ROBINSON, 1996; NATHUES et al., 2010) a 42 dias (CASTEEL et al., 1985) após a introdução da ração com excesso de selênio. Inicialmente os suínos apresentam acentuada diminuição do consumo e até rejeição da ração com altos níveis tóxicos (MAHAN; MOXON, 1984; SANFORD, 1990; PENRITH; ROBINSON, 1996; HÉLIE; SAUVAGEAU, 1998; KIM; MAHAN, 2001a). Quando era fornecida uma dieta sem excesso de selênio os animais voltavam a comer (MAHAN; MOXON, 1984). Experimentalmente, a rejeição pela dieta foi observada com altos níveis de selênio, dificultando assim a reprodução experimental da PSFS (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983). A evolução clínica até a morte pode variar de dois (SCHULTZ; HOFFMANN, 1995) a sete dias (CASTEEL et al., 1985).

Rações contendo 5 a 8 ppm de Se usadas na fase de crescimento podem causar anorexia, alopecia, lesões na borda coronária dos cascos e lesões degenerativas em fígado e rins. Problemas reprodutivos como atraso na concepção e nascimento de leitões fracos e natimortos foram observados em fêmeas que ingeriram rações contendo 10 ppm de Se (CARSON, 2006). O selênio é transferido para a glândula mamária, com isso o colostro e o leite podem conter altos níveis desse elemento e os animais recém-nascidos apresentarem sinais de alopecia e desprendimento dos cascos (KIM; MAHAN, 2001c). Níveis entre 10 e 27 ppm de Se podem induzir quadro paralítico em animais na fase de crescimento (CARSON, 2006).

Os sinais clínicos são marcados pelo surgimento abrupto (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995), caracterizados, inicialmente, por ataxia dos membros pélvicos (CASTEEL et al., 1985; PENRITH; ROBINSON, 1996; NATHUES et al., 2010) que se mantêm rígidos (SANFORD, 1990) e evoluem para paralisia (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; CASTEEL et al., 1985, CARSON, 2006; CASTEIGNAU et al., 2006). O envolvimento dos membros torácicos pode ocorrer (CASTEEL et al., 1985, STOWE et al., 1992), causar tetraparesia (STOWE et al., 1992; SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995; CARSON, 2006), posição de cão sentado (SANFORD, 1990; STOWE et al., 1992; PENRITH; ROBINSON, 1996; CASTEIGNAU et al., 2006) e decúbito esternal permanente. A enfermidade é afebril (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; PENRITH; ROBINSON, 1996) e os suínos mantêm o estado de alerta com apetite normal (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; CASTEEL et al., 1985; SANFORD, 1990; PENRITH; ROBINSON, 1996; CARSON, 2006), a micção e defecação normais (HARRISON et al., 1983). Alguns animais ainda podem apresentar depressão, dispneia (PENRITH; ROBINSON, 1996), andar rígido e arrastamento das pinças (STOWE et al., 1992).

2.5 Achados de necropsia e histopatológicos

As alterações macroscópicas são escassas (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; WILSON et al., 1988; SANFORD, 1990; STOWE et al., 1992; SCHULTZ; HOFFMANN, 1995; COSTA et al., 2011). Em alguns animais pode ser uma área focal e simétrica de depressão do parênquima com coloração levemente marrom ou pálida no corno ventral da substância cinzenta, na região das intumescências medulares (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; CASTEEL et al., 1985; SANFORD, 1990; DAVIDSON-YORK et al., 1999; MAXIE; YOUSSEF, 2007; NATHUES et al., 2010). Porções da medula torácica e lombar também podem estar acometidas (PENRITH; ROBINSON, 1996). Outras lesões que podem ser observadas incluem separação dos cascos na borda coronária (HARRISON et al., 1983; CASTEEL et al., 1985; BANHOLZER; HEINRITZI, 1998; HÉLIE; SAUVAGEAU, 1998; DAVIDSON-YORK et al., 1999; KIM; MAHAN, 2001a; CASTEIGNAU et al., 2006); áreas de necrose e descamação da pele na região dorsal (CASTEEL et al., 1985;

PENRITH; ROBINSON, 1996; CASTEIGNAU et al., 2006); pelos ásperos e alopecia parcial (HARRISON et al., 1983; BANHOLZER; HEINRITZI, 1998; KIM; MAHAN, 2001a; CASTEIGNAU et al., 2006).

Alterações microscópicas são observadas, principalmente, nas intumescências cervical e lombar da medula espinhal, na substância cinzenta do corno ventral do H medular (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; COSTA et al., 2011), entretanto podem ser encontradas também no tronco cerebral, principalmente em medula oblonga e ponte (CASTEIGNAU et al., 2006; NATHUES et al., 2010), nos núcleos faciais, motor do nervo trigêmeo, cuneiforme e grácil (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983). A observação das lâminas coradas dos segmentos afetados, sob uma luz clara, pode revelar áreas circulares pálidas, bilaterais e simétricas nos cornos ventrais (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983).

As lesões histológicas variam com a evolução da doença e quantidade de selênio ingerida (WILSON et al., 1988). A lesão encontrada é caracterizada por cavitação (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; WILSON et al., 1988; SANFORD, 1990; PENRITH; ROBINSON, 1996; COSTA et al., 2011), com perda neuronal (HARRISON et al., 1983; STOWE et al., 1992; PENRITH; ROBINSON, 1996; NATHUES et al., 2010), cromatólise e acidofilia neuronal (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; WILSON et al., 1988; NATHUES et al., 2010), raros eosinófilos (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; DAVIDSON-YORK et al., 1999; COSTA et al., 2011), proliferação de vasos (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; WILSON et al., 1988; STOWE et al., 1992; COSTA et al., 2011), com ativação endotelial (NATHUES et al., 2010), proliferação de células da glia (HARRISON et al. 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; WILSON et al., 1988; STOWE et al., 1992), principalmente astrócitos (COSTA et al., 2011) e focos de hemorragia (NATHUES et al., 2010). A substância branca adjacente a essas lesões pode estar vacuolizada por desmielinização (STOWE et al., 1992) relacionada à lesão primária dos neurônios motores (ZACHARY, 2009). No estudo de Harrison et al. (1983), não foram observadas células gitter nas lesões, já outros relatos apresentam o infiltrado dessas células (SANFORD, 1990; PENRITH; ROBINSON, 1996; DAVIDSON-YORK et al., 1999; CASTEIGNAU et al., 2006; COSTA et al., 2011). As alterações microscópicas são variáveis, o que possibilita a tentativa de determinar a cronologia para as alterações (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995). Wilson, Scholz & Drake (1983) caracterizaram as lesões

microscópicas de acordo com a sua evolução. Lesões agudas em núcleos do tronco encefálico e em região ventral do H medular são caracterizadas por proliferação endotelial, acidofilia e cromatólise neuronal, cavitações, infiltrado de eosinófilos principalmente perivascular, gliose leve e degeneração fibrinoide dos vasos adjacentes ao núcleo facial. Animais que permaneceram em decúbito por 21 dias apresentaram lesões neuronais semelhantes às do quadro agudo, com perda neuronal, intenso infiltrado de células da glia, proliferação endotelial mínima, extenso infiltrado inflamatório mononuclear, infiltrado de eosinófilos reduzidos ou ausentes. Em animais com sinais clínicos crônicos são observadas grandes áreas de microcavitações com infiltrado de macrófagos (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983). Animais que sobreviveram à intoxicação podem apresentar perda neuronal e gliose nas intumescências medulares (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983). Perda axonal e vacuolização nas raízes ventrais dos nervos espinhais, ocasionalmente, ocupada por macrófagos são descritas por Costa et al. (2011), ao utilizar coloração pelo azul rápido de luxol.

Alterações extra-medulares são descritas por Stowe et al. (1992) e Penrith & Robinson (1996) e caracterizadas por tumefação difusa, perda da estriação, hialinização e desintegração de miofibras esqueléticas e, no coração, áreas focais de hipereosinofilia, picnose e vacuolização de cardiomiócitos.

2.6 Diagnóstico e diagnóstico diferencial

O diagnóstico de intoxicação por selênio pode ser feito por meio dos sinais clínicos, dos achados macroscópicos, microscópicos e da dosagem de selênio em tecidos e da ração (CARSON, 2006). Amostras de fígado são consideradas as melhores para análise dos níveis de selênio, por possuir maior quantidade do microelemento e aumentos graduais com o aumento do Se na ração (MAHAN; MOXON, 1984). Aparentemente, elevados níveis de selênio encontrados nos tecidos não possuem correlação com a severidade dos sinais clínicos e das lesões encontradas (PANTER et al., 1996; DAVIDSON-YORK et al., 1999) e sim com o tipo de selênio ingerido. O selênio de origem orgânica tem maior tendência a acumular nos tecidos (PANTER et al., 1996; KIM; MAHAN, 2001a). Níveis superiores a 3 ppm em fragmentos frescos de fígado e rim são indicativos de intoxicação (CARSON, 2006). O selênio pode ser

dosado em amostras de sangue e tecidos do tegumento como pelos, parede do casco ou sola, sendo considerada intoxicação, quando detectados níveis superiores a 2 ppm no sangue e a 10 ppm em tegumento (GINN; MANSELL; RAKICH, 2007). Amostras de soro podem ser usadas para o diagnóstico *in vivo* (CASTEIGNAU et al., 2006). A suplementação recomendada desse micro elemento na ração para evitar casos de deficiência de selênio é de 0,1 a 0,3 mg de selênio/ Kg (CARSON, 2006), com nível máximo de 0,5 mg de selênio/Kg (BANHOLZER; HEINRITI, 1998). A menor concentração considerada tóxica é de 5 mg/kg (MAHAN; MOXON, 1984; KIM; MAHAN, 2001a; CARSON, 2006).

Para os diagnósticos diferenciais devem ser levados em consideração doenças que cursam com paralisia flácida, seja por acometimento de medula espinhal, como a raiva (PESSOA et al. 2011) e doença de Teschen (SALLES et al., 2011), ou enfermidades neuromusculares como o botulismo (RAYMUNDO et al. 2010), ou necrose muscular como a intoxicação por antibióticos ionóforos (CARPENTER; CHARBONNEAU; JOSEPHSON, 2005) e intoxicação por *Senna occidentalis* (MARTINS et al., 1986). Outras doenças que cursam com manifestações neurológicas, que podem acometer animais jovens como meningites bacterianas (HIGGINS & GOTTSCHALK, 2006, doença do edema (FAIRBROTHER & GYLES, 2006), intoxicação por *Aeschynomene indica* (OLIVEIRA et al., 2005) e intoxicação por sal (BOOS et al., 2012) devem ser descartadas em quadros de intoxicação aguda por selênio.

2.7 Controle e profilaxia

Não há tratamento para a intoxicação. Como forma de controle inclui o reconhecimento e a remoção da fonte de excesso de selênio, assim, prevenindo a ocorrência de novos casos (DE LAHUNTA, 2009). Boas práticas na fabricação da ração são importantes para evitar intoxicação por selênio (SCHULTZ; HOFFMANN, 1995).

2.8 Intoxicação em outras espécies

A forma aguda de intoxicação por selênio é descrita em bovinos (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991) e equinos (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991;

DESTA et al. 2011), os quais apresentam alteração na postura e na movimentação, diarreia aquosa, hipertermia, dispneia, sinais de dor abdominal, prostração e morte (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991; DESTA et al. 2011). Ovinos intoxicados demonstram apenas depressão e morte súbita (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991; STRUGNELL; PAYNE; MATTHEWS, 2010). Alterações macroscópicas incluem hemorragias no endocárdio, enterite (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991; DESTA et al. 2011), congestão e hemorragia pulmonares, congestão passiva do fígado (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991), hemorragias nos músculos esqueléticos e áreas pálidas no miocárdio, que correspondem a áreas de necrose isquêmica aguda (DESTA et al. 2011).

A forma crônica é descrita de duas formas: “*alkali disease*” e “*blind staggers*”. A primeira é caracterizada por apatia, emagrecimento, pelos ásperos e com perda de pelos especialmente na crina e na cauda (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991; GINN; MANSELL; O’TOOLE; RAISBECK 1995; RAKICH, 2007; HARGIS; GINN, 2009), problemas reprodutivos (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991), lesões de casco que começam na banda coronária e pode levar à separação do casco ou a formação de sulcos, rachaduras ou ondulações paralelas à borda coronária, resultando em claudicação (O’TOOLE; RAISBECK 1995; GINN; NÉSPOLI et al., 2001; MANSELL; RAKICH, 2007). Essa forma de intoxicação pode acometer bovinos, equinos (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991; GINN; MANSELL; RAKICH, 2007) e ovinos (HARGIS; GINN, 2009). Foram relatados também casos de intoxicação crônica em veados de cauda branca, com perda de peso, laminite, necrose e fibrose do miocárdio (AL-DISSI; BLAKLEY; WOODBURY, 2010).

A outra apresentação da intoxicação crônica por selênio, “*blind staggers*”, ocorre em bovinos e ovinos e se caracteriza por três fases. Inicialmente, há sinais de perda da visão, os animais tropeçam em obstáculos e há diminuição do apetite, além de evolução para ataxia dos membros torácicos e anorexia. No último estágio, ocorre paralisia da língua, dificuldade de deglutição, cegueira, dispneia, dor abdominal, hipotermia, opacidade de córnea e morte (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991). Essa apresentação é questionada, pois as alterações microscópicas do sistema nervoso não são detalhadas (JAMES; MAVLAND; PANTER, 1991) e não há comprovação do envolvimento do selênio (O’TOOLE; RAISBECK 1995). O’Toole (1996), em uma

análise crítica da doença, concluiu que outras enfermidades não diagnosticadas na época devem estar envolvidas.

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1 Surto 1

Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos junto ao proprietário e ao veterinário responsável pela granja, em visitas à propriedade. Amostras de tecidos de um animal (Suíno 1) foram enviadas ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), já fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, para análise histopatológica. A partir da suspeita obtida neste material foi realizada visita a propriedade e sete animais (Suínos 2,3,4,5,6,7 e 8) foram necropsiados e amostras de tecidos foram colhidas em solução de formalina tamponada a 10% e fixadas por 24 a 48 horas, realizados cortes, os quais foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 3µm foram corados pela hematoxilina e eosina. Em alguns cortes foi realizada a coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (PROPHET et al., 1992).

Amostras de fígado de cinco animais (Suínos 4,5,6,7 e 8) foram encaminhadas refrigeradas para dosagem de selênio pelo método de espectrometria atômica quantitativa no Laboratório Green Lab[®], Porto Alegre/RS. Amostras de ração foram encaminhadas ao laboratório CBO Análises de Campinas - SP pela empresa que fornecia premix à granja, para dosagem de Se pelo método de absorção atômica em forno de grafite.

Cortes de medula espinhal (cervical, intumescência cervical, torácica, lombar e intumescência lombar) e cortes do encéfalo (córtex frontal, cerebelo, tálamo, corpo estriado, colículo, pedúnculo cerebelar, ponte e óbex) foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para a Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP), utilizando anticorpo policlonal anti-GFAP (DAKO, Santa Barbara, CA, Z 0334) na diluição de 1/500 em Phosphate Buffered Saline (PBS), incubados em câmara úmida “*overnight*” a 4°C, empregando-se o método estreptavidina-biotina. Foram feitos cortes histológicos de 3µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath[®]),

secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60° C por 3 a 4 horas. Posteriormente, os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% em metanol por 10 minutos em temperatura ambiente e lavados em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica, utilizou-se solução de TRIS EDTA pH 9,0 (2,4 g Tris Base e 0,2 g de EDTA em 1 litro de água destilada, com ajuste do pH com HCl a 1m), por 10 minutos, em panela de pressão a 100° C. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com leite desnatado 5% (Molico[®]) diluído em água destilada, durante 15 minutos. O cromógeno utilizado foi o 3,3- diaminobenzidina (DAB), durante 5 a 7 segundos. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente, lavadas em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações crescentes de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Germany).

Cortes das mesmas amostras foram submetidos ao teste imuno-histoquímica para Proteína S100 (S100), utilizando anticorpo policlonal anti-S100 (DAKO, Santa Barbara, CA, Z 0311) na diluição de 1/200 em PBS incubados em câmara úmida “*overnight*” a 4°C, empregando-se o método estreptavidina-biotina. Foram feitos cortes histológicos de 3µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath[®]), secadas, verticalmente, em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60° C por 3 a 4 horas. Após, os corte foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool, até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% em metanol por 15 minutos em temperatura ambiente e lavados em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica, utilizou-se solução de tampão citrato (2,1 gramas de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%) por 20 minutos em panela de pressão a 100° C. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com leite desnatado 5% (Molico[®]) e diluídos em água destilada durante 20 minutos. O cromógeno utilizado foi o VECTOR[®]NovaRED durante 2 a 3 minutos. Os cortes foram contra-corados e montados como anteriormente descritos.

Imuno-histoquímica, contra o antígeno relacionado ao Fator de von Willebrand (Fator VIII), foi realizada nos mesmos cortes, utilizando anticorpo monoclonal anti-

Fator de Crescimento Endotelial Vascular Humano (DAKO, Santa Barbara, CA, clone VG1, código M7273) na diluição de 1/800 em PBS incubados em câmara úmida “overnight” a 4°C, com o método streptavidina-biotina. Foram feitos cortes histológicos de 5µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath[®]), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60° C por 3 a 4 horas. Após, os corte foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% em metanol por 15 minutos em temperatura ambiente e lavados em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica, utilizou-se solução de tampão citrato (2,1 gramas de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%) por 3 minutos em panela de pressão à 125° C. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com leite desnatado 5% (Molico[®]) e diluídos em água destilada durante 30 minutos. O cromógeno utilizado foi o 3,3-diaminobenzidina (DAB) durante 70 a 80 segundos. Os cortes foram contracolorados e montados como, anteriormente, descrito. Em todos os protocolos foram usados cortes controle positivo, junto com os cortes serem testados e lâminas controles negativos, onde foi substituído apenas o anticorpo por solução de PBS.

3.2 Surto 2

Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos junto ao proprietário e ao veterinário responsável pela nutrição dos animais. Três suínos (Suínos 9,10 e 11) com aproximadamente 22 dias de idade foram encaminhados para o SPV da UFRGS para necropsia. Fragmentos de diversos órgãos foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 24 a 48 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina e eosina e, em alguns cortes, foi realizada a coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (PROPHET et al., 1992).

Amostras de fígado foram resfriadas e encaminhadas para exame de espectrometria atômica quantitativa de selênio no Laboratório Green Lab[®] de Porto Alegre - RS. Foi realizada uma visita a propriedade 23 dias após o início do fornecimento da ração contaminada, para avaliação dos animais sobreviventes e coleta de informações adicionais.

Após 44 dias do início do consumo da ração contaminada foi feita uma segunda visita à propriedade com coleta de amostras de seis animais, quatro (Suínos 12,13,14 e 15) que sobreviveram ao surto e dois controles (Suínos 16 e 17), que não haviam ingerido a ração. Foram coletados fragmentos de fígado, coração, intestino, pernil, paleta e lombo e refrigerados para dosagem de selênio. As dosagens foram realizadas para avaliação dos níveis após os surtos de intoxicação e possível liberação do lote para o consumo. As medulas espinhais foram acondicionadas em solução de formalina tamponada a 10% e processadas para exame histológico.

Fragmentos da medula espinhal e do encéfalo com lesão microscópicas foram submetidos a testes de imuno-histoquímica para Proteína Ácida Glial Fibrilar, Proteína S100 e antígeno relacionado ao Fator de von Willebrand utilizando protocolo descrito anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1 Surto 1

Em janeiro de 2010, leitões de dois lotes de uma granja localizada no município de Cruzeiro do Iguaçu/PR, apresentaram quadros de paralisia. No primeiro lote, 36 de um total de 120, apresentaram quadro de paralisia seis dias após entrada na creche (27 dias de idade). Desses, dois morreram e 18 foram eutanasiados. Outros 16 animais que não morreram durante o surto apresentaram, aos 50 dias de idade, dificuldade locomotora, andar sobre a ponta dos cascos, leves tremores musculares e decúbito frequente. Esses suínos apresentavam graus variados de desprendimento do casco na borda coronária. Um animal desse grupo, que apresentava dificuldade locomotora acentuada, foi eutanasiado (Suíno 8).

Com o início dos quadros de paralisia, o proprietário optou por suspender o fornecimento da ração e, após a troca por outra remessa, observou diminuição do problema. Outros dois lotes que entraram na creche e não apresentaram problemas. O proprietário optou por adicionar antibiótico e inativador de micotoxina à ração problema e fornecer ao novo lote de 100 animais que seria desmamado. Após 6 dias de consumo dessa ração 16 leitões desse lote (16%), com idade aproximada de 27 dias, apresentaram quadros de paralisia. Os animais afetados permaneciam sentados, com início de

paralisia dos membros pélvicos. Esses permaneciam afastados lateralmente (Figura 1) e alguns animais adotavam a “posição de cão sentado”. Alguns animais apresentavam tetraparesia, todos mantinham o estado de alerta (Figura 2) e temperatura em torno de 39°C. Desse lote foram necropsiados seis animais (Suínos 2 ao 8).



Figura 1 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suínos 2 e 3 com 7 dias de creche (34 dias), apresentavam dificuldade de locomoção e paralisia de membros pélvicos.



Figura 2 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suínos com 14 dias de creche (41 dias), com paralisia dos membros pélvicos. Observar animais com membros afastados ou “posição de cão sentado”.

Não foram observadas alterações durante a necropsia dos suínos 2 e 3, mas na avaliação da medula após fixação notaram-se áreas circulares, levemente, amareladas no corno ventral das intumescências cervicais e lombares (Figura 3). Nos suínos 4, 5, 6 e 7 a única alteração significativa foi observada nos cascos, que apresentavam linha avermelhada na borda coronária (Figura 4). Após fixação da medula apenas o suíno 7 apresentou lesão discreta nas intumescências cervicais e lombares. No suíno 8, que se recuperou do surto aos 25 dias ocorreu desprendimento dos cascos de todos os membros (Figura 5).



Figura 3 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Corte transversal da medula espinhal em intumescência cervical com área circular discretamente amarelada no corno ventral do H medular.



Figura 4 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 4. Linha avermelhada na borda coronária do casco do membro torácico direito.



Figura 5 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Desprendimento do casco na borda coronária.

Lesões microscópicas foram encontradas na medula espinhal de todos os animais, principalmente em intumescências cervical e lombar; somente um animal apresentava lesão em toda extensão da medula espinhal e na região da ponte (Suíno 8). Em três casos, a lesão era mais severa na intumescência lombar (Suínos 1-3), em dois na intumescência cervical (Suínos 4 e 5) e, em dois casos não havia diferença entre a severidade da lesão nas intumescências (Suínos 6 e 7). No Suíno 8, a porção cervical da medula foi a mais afetada. As lesões medulares eram encontradas, exclusivamente, na substância cinzenta do corno ventral do H medular e eram caracterizadas por áreas com vacuolização do neurópilo no interior da lesão e, principalmente, na sua periferia, formando microcavitações (Figura 6); neurônios com aumento de volume e pericário arredondado. A substância de Nissl estava mais dispersa na periferia do que na porção central (cromatólise periférica) (Figura 7) e, por vezes, com o desaparecimento total da substância Nissl (cromatólise total) (Figura 8). Os núcleos, por vezes, estavam deslocados para periferia, ou mesmo ausentes; havia neurônios diminuídos de tamanho, sem núcleo e com citoplasma, levemente, eosinofílico e homogêneo (Figura 9), muitas vezes, cercados por células da glia e havia neurônios fragmentados com infiltrado de macrófagos (Neuronofagia) (Figura 10) além de perda neuronal na região (Figura 6).

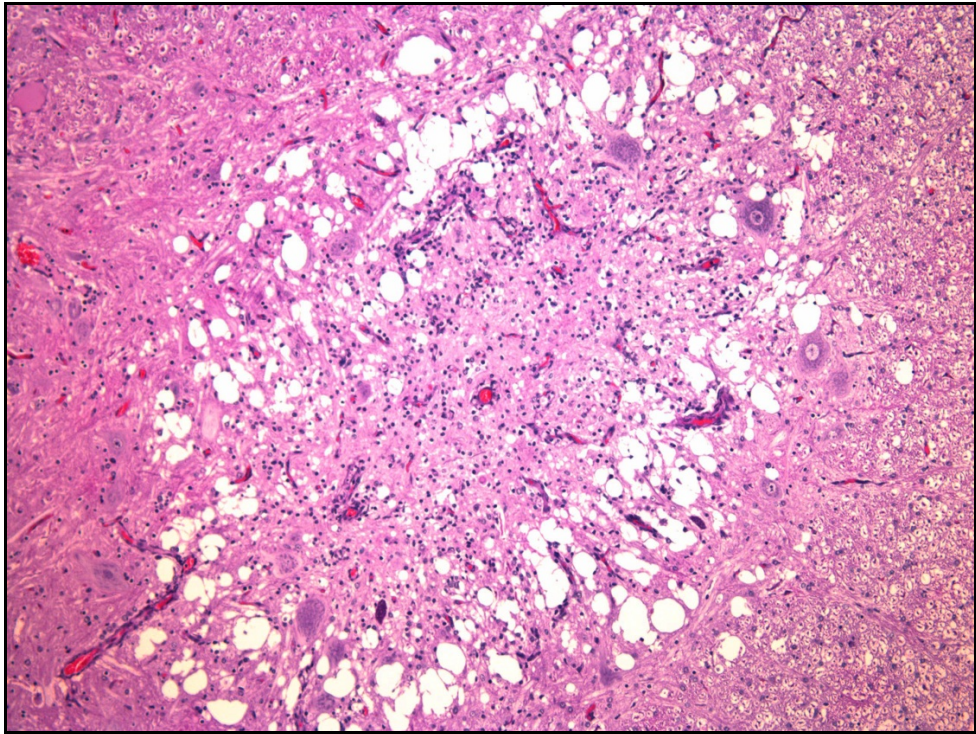


Figura 6 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 7. Intumescência lombar. Microcavitações, perda neuronal, microgliose e proliferação de células endoteliais no corno ventral do H medular. Hematoxilina eosina (HE), Obj 10.

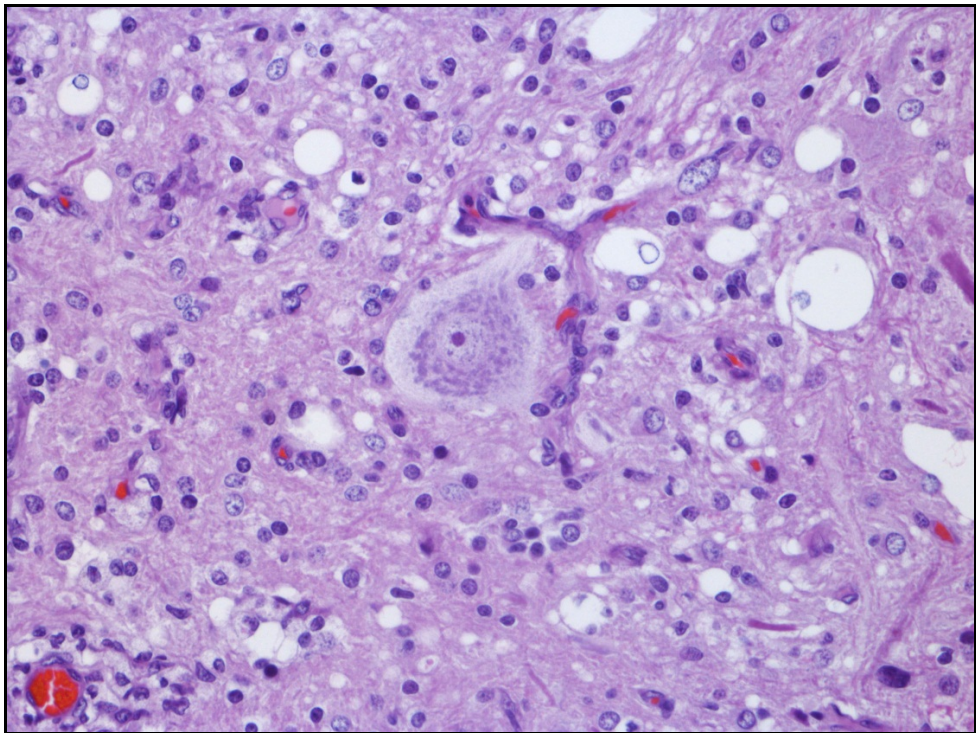


Figura 7 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 6. Intumescência lombar. Neurônio aumentado de volume, contorno citoplasmático levemente arredondado e substância de Nissl dispersa na periferia (Cromatólise periférica). Hematoxilina eosina, Obj. 40.

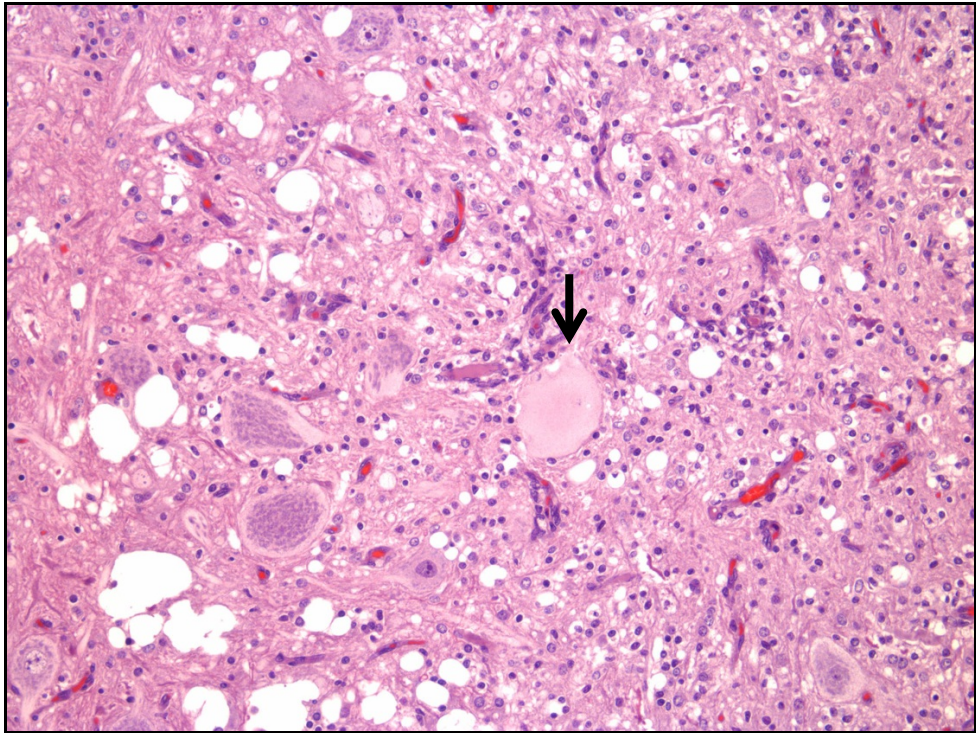


Figura 8 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 6. Intumescência lombar. Neurônio (seta) aumentado de tamanho, substância de Nissl e núcleo ausentes. Hematoxilina eosina, Obj. 20.

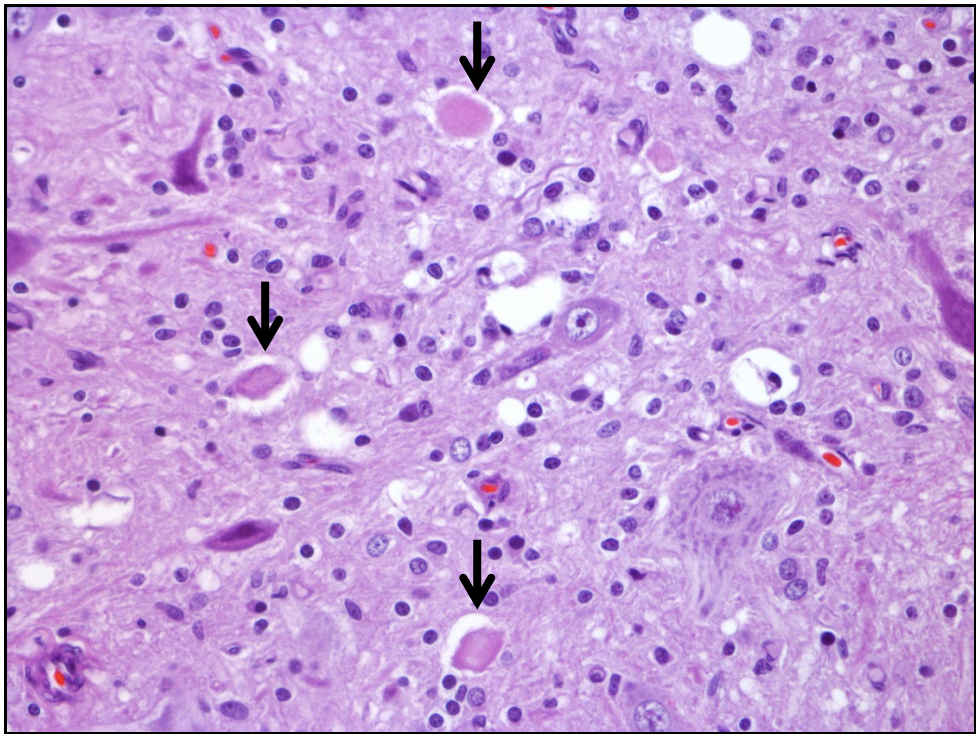


Figura 9 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 4. Intumescência lombar com neurônios diminuídos de tamanho, citoplasma levemente eosinofílico e homogêneo (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40x.

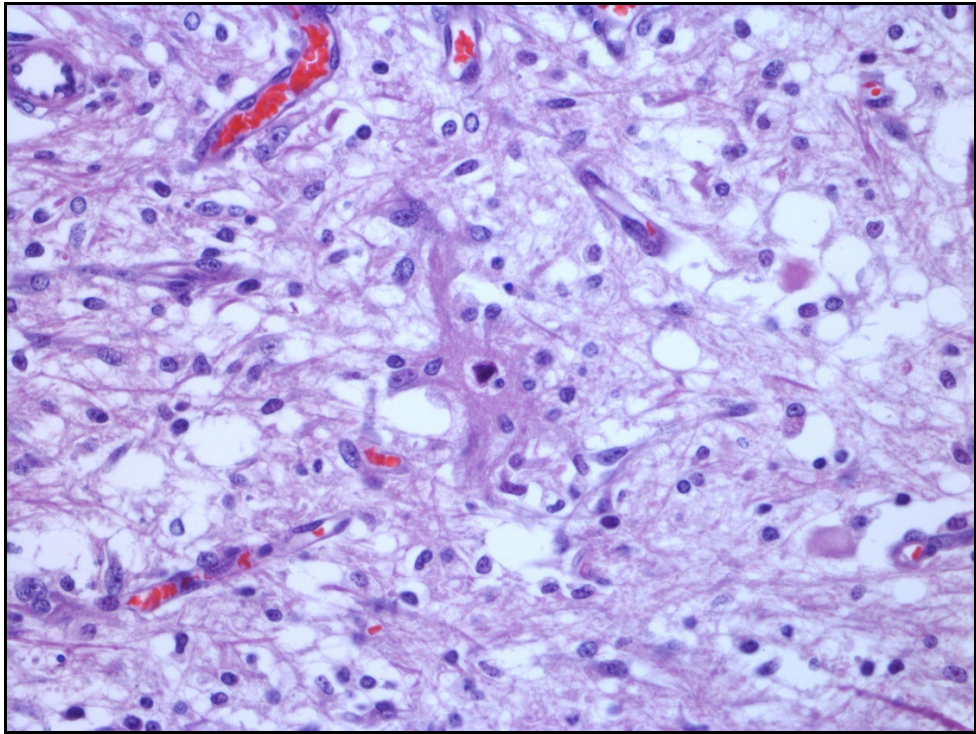


Figura 10 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 3. Intumescência cervical, neurônio com citoplasma levemente eosinofílico e núcleo picnótico, circundado por células da glia e macrófagos (neuronofagia). Hematoxilina eosina, Obj. 40x.

Microgliose foi observada nos focos da lesão com infiltrado de monócitos, esses com aspecto de macrófagos espumosos (células Gitter) (Figura 11). Na coloração de ácido periódico de Schiff, essas células apresentaram grânulos avermelhados no interior do citoplasma (Figura 12). Havia grande aumento no número de vasos (Figura 6), esses ativados e intensa tumefação endotelial, evidenciados na imuno-histoquímica de von Willebrand (Figura 13).

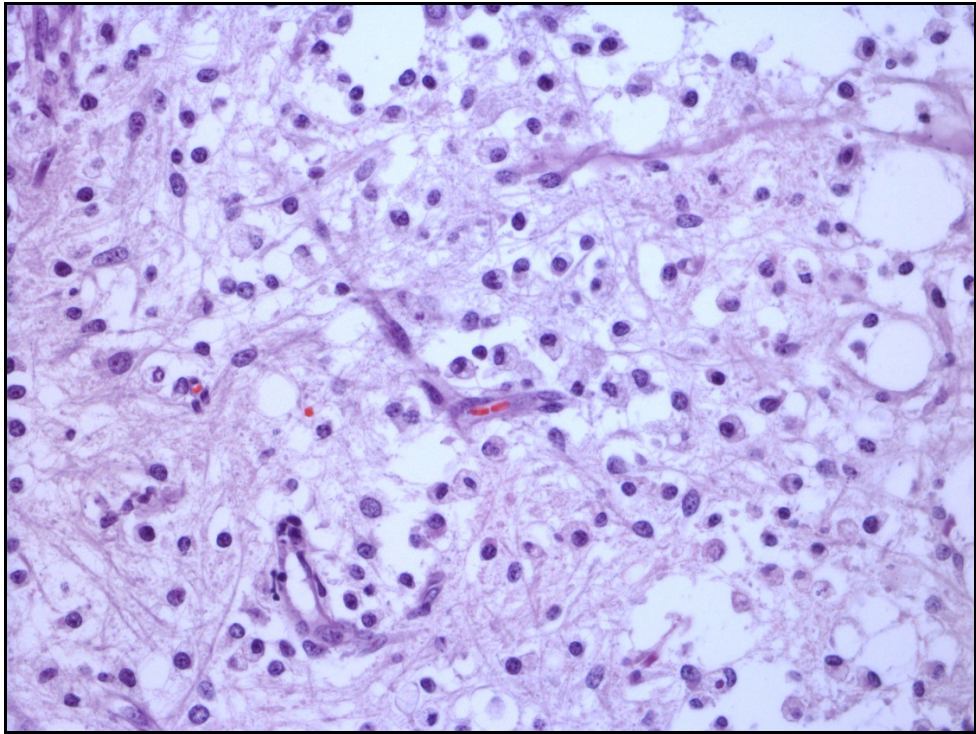


Figura 11 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Intumescência cervical com infiltrado acentuado de macrófagos com citoplasma vacuolizado (Células Gitter). Hematoxilina eosina (HE), Obj 40.

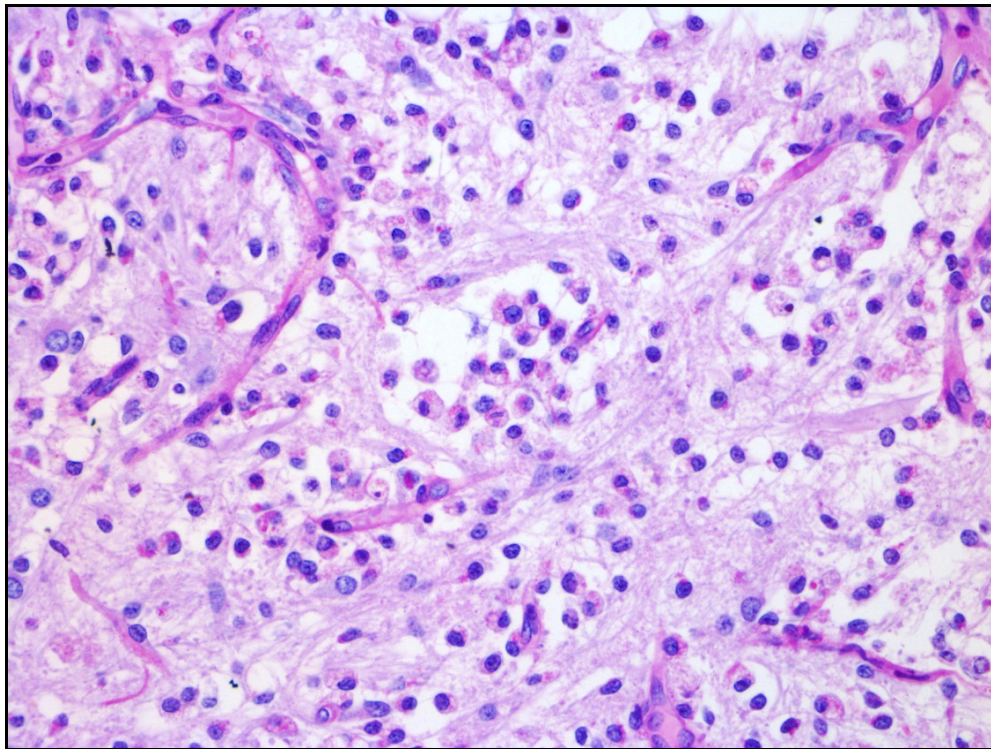


Figura 12 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Intumescência cervical com infiltrado acentuado de macrófagos (Células Gitter) com citoplasma corados na coloração de Ácido Periódico de Schiff, Obj 40.

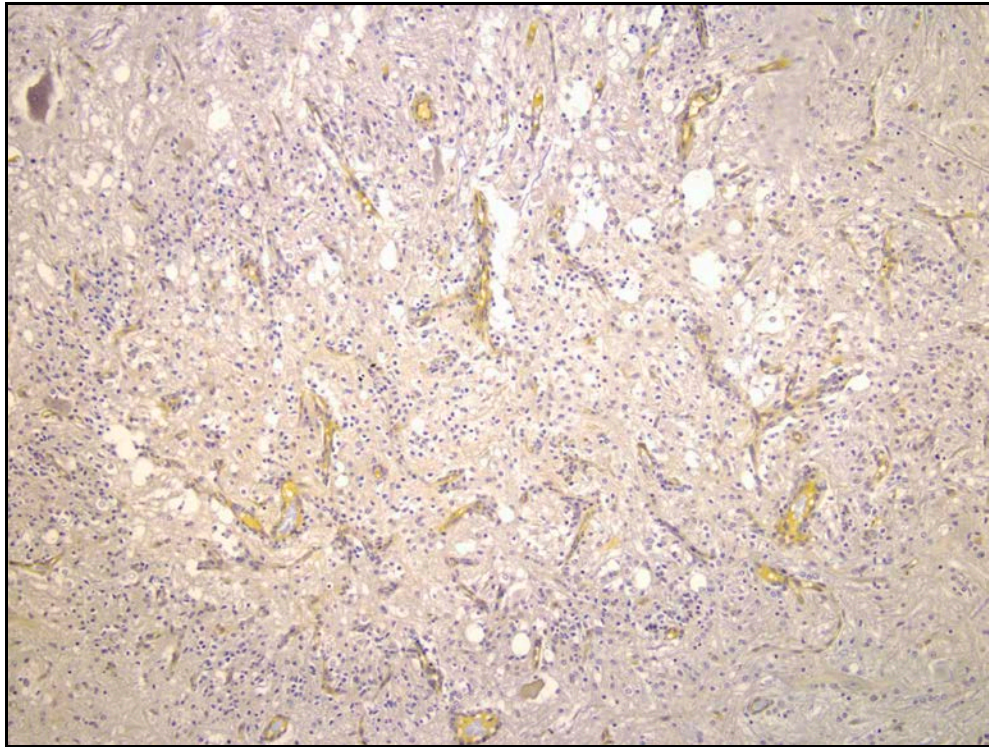


Figura 13 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Intumescência lombar. Evidenciação da proliferação de vasos no corno ventral do H medular pela imuno-histoquímica de von Willebrand. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), Obj. 10.

Em alguns animais foram evidenciadas astrogliose e astrocitose no foco da lesão com auxílio da técnica de imuno-histoquímica de GFAP (Figura 14). E um caso (suíno 8) foram observados astrócitos com citoplasma abundante, eosinofílico e núcleo excêntrico (gemistócitos) (Figura 15). Havia astrócitos multifocais com tumefação nuclear, cromatina dispersa com nucléolos proeminentes, esses dispostos isoladamente, em duplas ou trios (Astrócitos de Alzheimer tipo II) (Figura 16), que foram positivos na IHQ para Proteína S100 (Figura 17) e negativos para GFAP (Figura 18). Em alguns casos foi observada também hemorragia multifocal discreta (Suínos 1, 2 e 6). No suíno 8 estavam também afetadas porções da medula cervical e torácica e formavam pontes unindo os dois cornos ventrais e ainda se observou lesão na ponte (tronco encefálico) com envolvimento das formações reticulares (Figura 19).

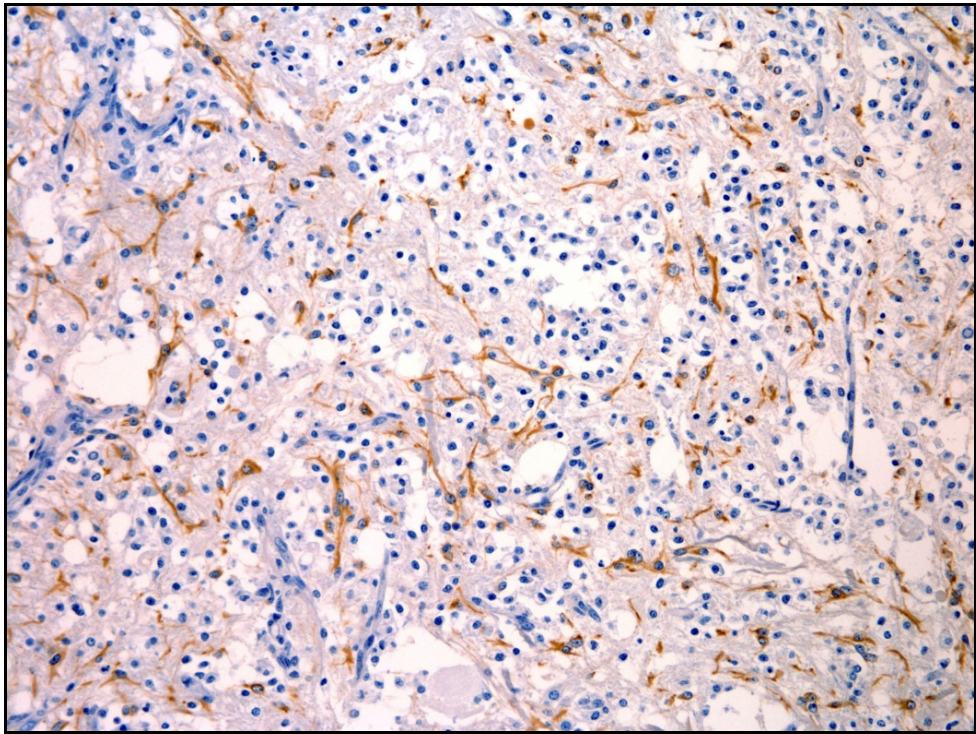


Figura 14 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 2. Marcação positiva em astrócitos e seus prolongamentos. Imuno-histoquímica para Proteína Ácida Glial Fibrilar. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), Obj. 20.

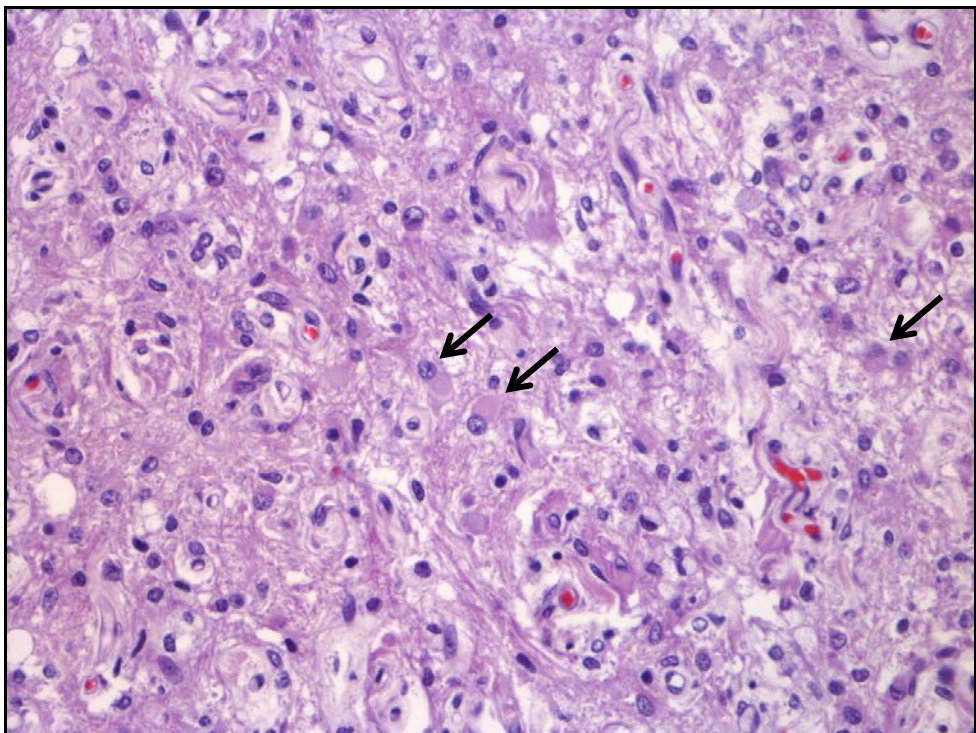


Figura 15 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinhal, astrócitos gemistocíticos com citoplasma abundante, eosinofílico e núcleo excêntrico (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40.

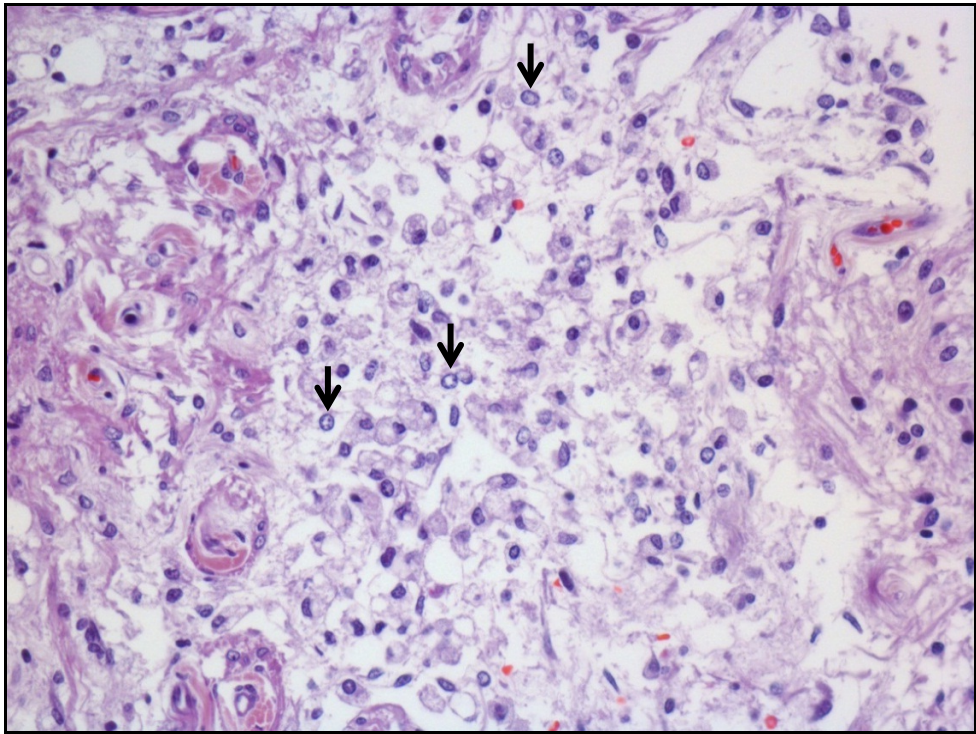


Figura 16 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinhal; astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa com nucléolos proeminentes. Hematoxilina eosina, Obj. 40.

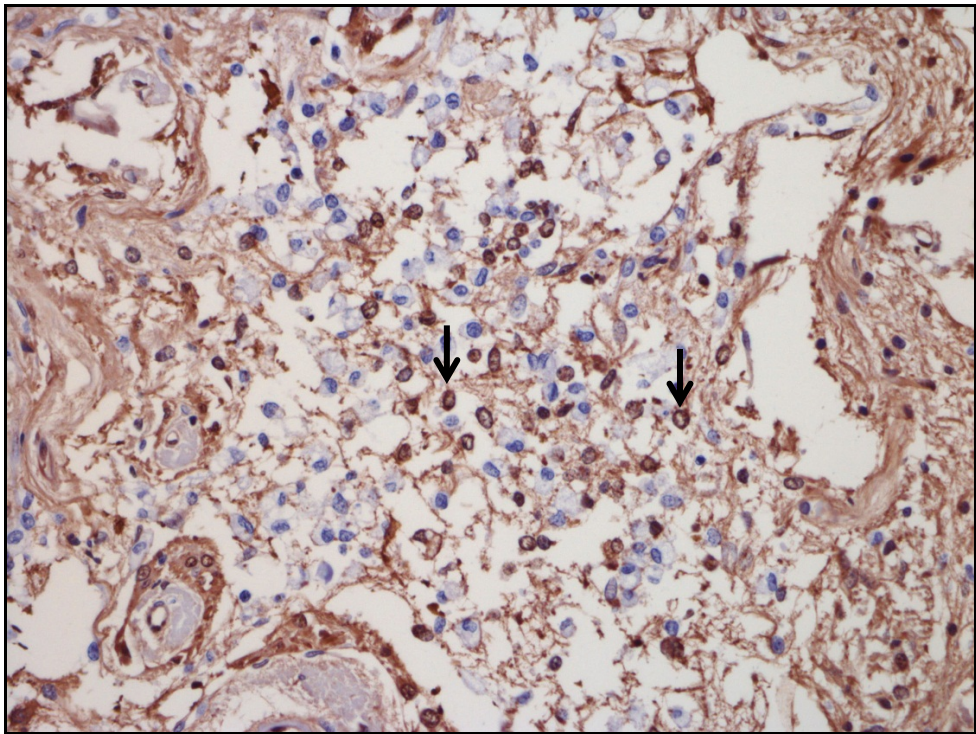


Figura 17 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinhal, astrócitos tumefeitos marcados na imuno-histoquímica para proteína S-100 (setas). Método estreptavidina-biotina, cromógeno VECTOR® NovaRED, Obj. 40.

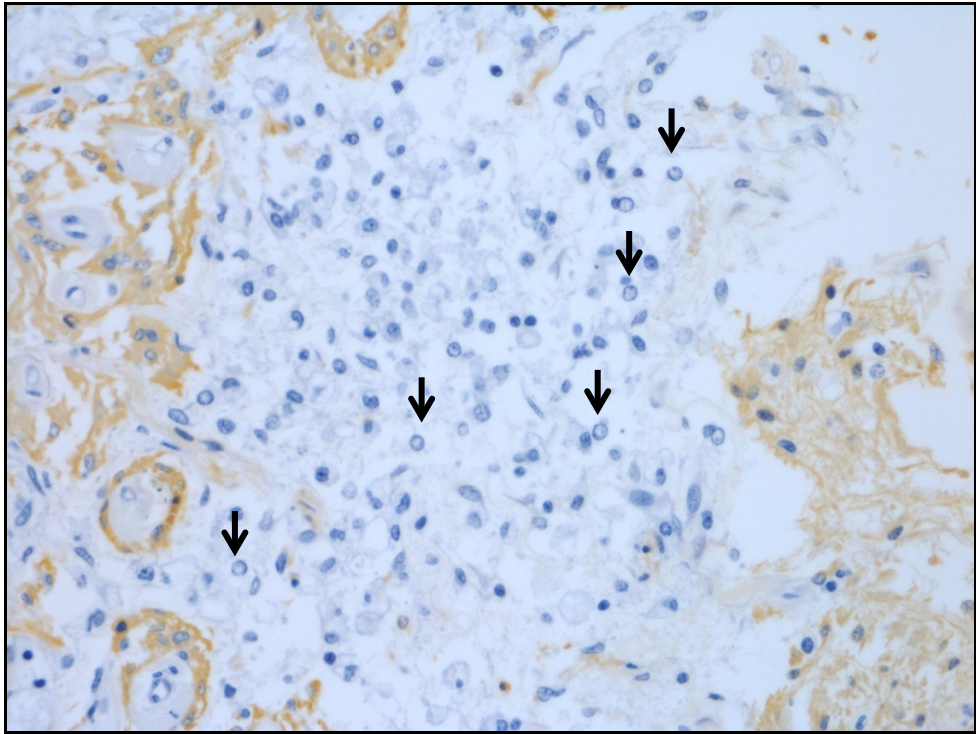


Figura 18 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinhal, astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa com nucléolos proeminentes não marcados na imuno-histoquímica para GFAP (setas). Método estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), Obj. 40.

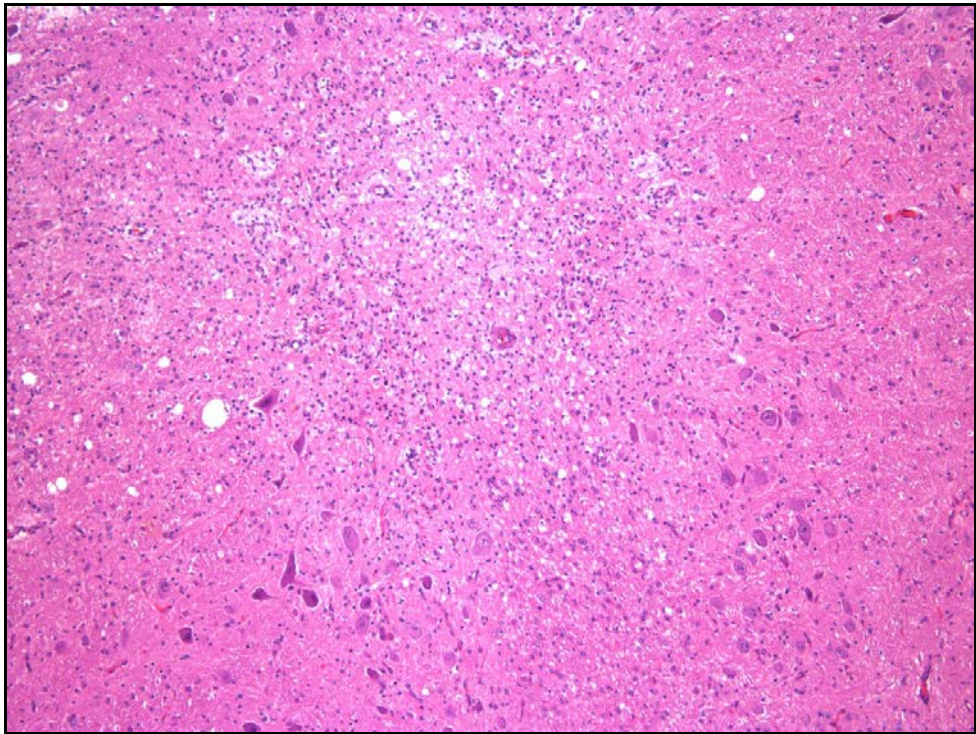


Figura 19 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Tronco encefálico (ponte); ponte, formação reticular com vacuolização e microgliose. Hematoxilina eosina, Obj. 10.

Em alguns casos se observou vacuolização das bainhas de nervos (degeneração Walleriana) (Figura 20) e estruturas eosinofílicas, ovais ou circulares (esferoides axonais) na substancia branca adjacente à área afetada (Figura 21). A distribuição e intensidade das lesões estão distribuídas na Tabela 1 e a intensidade de marcação, assim como sua distribuição, estão dispostas na Tabela 2.

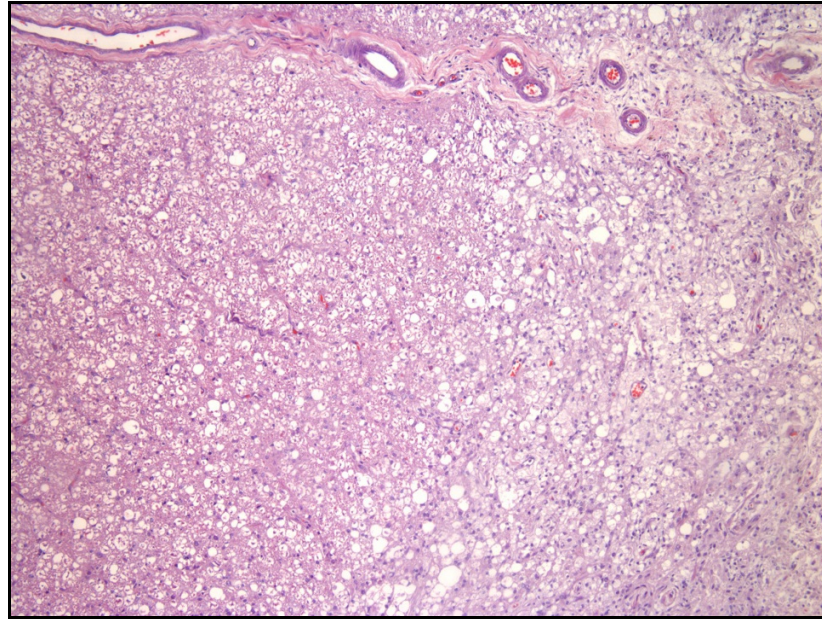


Figura 20 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinhal com degeneração walleriana. Hematoxilina eosina, Obj. 10.

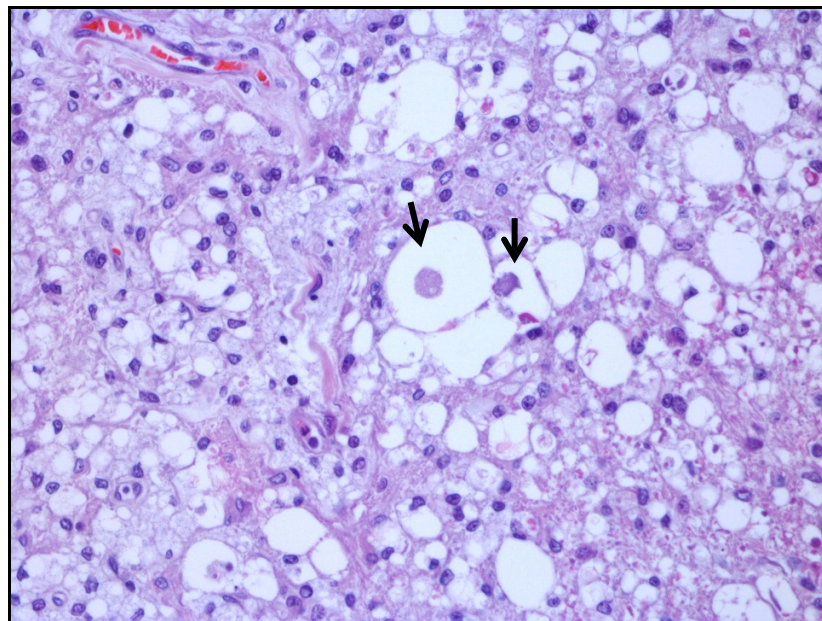


Figura 21 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Suíno 8. Porção cervical da medula espinhal, estruturas eosinofílicas, ovais ou circulares (esferoides axonais) (Setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40.

Tabela 1 – Intoxicação por Selênio. Surto 1. Distribuição e intensidade das lesões histológicas no sistema nervoso central.

Suíno	Localização	Células Gitter	Microgliose	PE	AAII	AG	Cromatólise	Neuronofagia	RNN	MC	Hemorragia	Perda Neuronal	DW	EA
1	IC	+	++	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+
	IL	++	+++	++	0	0	++	+	0	+	+	++	++	+
2	IC	+++	++	+++	0	0	+	+	0	++	+	++	0	0
	IL	++	++	+++	+	0	0	+	0	++	0	+	0	0
3	IC	++	++	++	+	0	+	0	+	+	0	++	0	0
	IL	++	++	++	+	0	+	+	+	+	0	++	0	0
4	IC	+	++	+*	++	0	0	0	0	++	0	++	0	0
	IL	0	+	+	+++	0	0	0	++	++	0	+	0	0
5	IC	+	++	+	+	0	0	+	++	++	0	+	+	+
	IL	+	++	+	+	0	+	+	+	++	0	+	+	+
6	IC	+	++	++	++	0	+	+	+	++	+	+	0	0
	IL	+	++	++	+	0	++	+	+	+++	0	++	0	0
7	IC	+	++	++	+++	0	+	0	+	+++	0	++	+	+
	IL	+	+	+	++	0	+	0	+	+++	0	++	+	0
8	C	++	+	+++	0	++	0	0	+	+	0	+++	+++	+++
	IC	0	+	++	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0
	T	+	+	++	+	0	0	0	++	+	0	++	++	++
	L	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	+	0	0
	IL	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0
	P	++	++	++	++	0	0	0	+	+	0	0	0	0

C (Porção Cervical), IC (Intumescência Cervical), T (Porção Torácica), L (Porção Lombar), IL (Intumescência Lombar), P (Ponte), PE (Proliferação Endotelial com hipertrofia e hiperplasia), AAII (Astrócitos Alzheimer tipo II), AG (Astrócitos gemistocíticos), RNN (Restos de Neurônios Necróticos), MC (Microcavitações), DG (Degeneração Walleriana), EA (Esferoides axonais). Intensidade da lesão: 0 = ausente, + = leve, ++ = moderada, +++ = acentuada. * sem hipertrofia e hiperplasia endotelial, somente proliferação de vasos.

Tabela 2 – Intoxicação por selênio. Surto 1. Distribuição das marcações imuno-histoquímicas.

Suíno	Localização	GFAP	Proteína S-100	von Willenbrand
1	IC	+	+	+
	IL	++	++	++
2	IC	+++	+	+++
	IL	+++	+	+++
3	IC	+++	+	++
	IL	+++	+	++
4	IC	++	++	++
	IL	+	+++	+
5	IC	++	+	+
	IL	+	++	+
6	IC	+	++	++
	IL	+	++	+
7	IC	+	+++	++
	IL	+	++	+
8	C	+++	+++	+++
	IC	0	0	++
	T	+	+	++
	L	0	0	+
	IL	0	0	+
	P	0	0	++

GFAP (Proteína Ácida Glial Fibrilar), C (Porção Cervical), IC (Intumescência Cervical), T (Porção Torácica), L (Porção Lombar), IL (Intumescência Lombar), P (Ponte), Intensidade da marcação: 0 = ausente, + = leve, ++ = moderada, +++ = acentuada.

O resultado da dosagem de selênio nos fígados dos suínos 4, 5, 6, 7, e 8 estão representadas na Tabela 3. A dosagem de selênio da ração fornecida aos animais foi de 3,9 mg de Se/kg de ração.

Tabela 3 – Intoxicação por Selênio. Surto 1. Dosagem de selênio em amostras de fígado refrigerado.

Animal	Dosagem de Selênio mg Se/Kg
Suíno 4	3,34
Suíno 5	4,70
Suíno 6	10,0
Suíno 7	3,84
Suíno 8	4,0

4.2 Surto 2

Durante o mês de março de 2011, suínos de uma granja próxima à cidade de Dois Vizinhos/PR apresentaram sinais de paralisia flácida dos membros pélvicos, seguida de paralisia flácida dos membros torácicos, decúbito lateral, bradipneia, insuficiência respiratória e agonia, com morte de 350 animais (15,3%). No galpão problema, havia 4570 animais com idade entre 15 e 22 dias, divididos em dois lotes submetidos a rações diferentes. Após 24 horas da introdução da nova partida da ração, o proprietário notou que os leitões de um lote (2285 animais) ingeriram menos ração que o esperado. Aproximadamente, 30 horas após a ingestão da ração, funcionários da granja notaram que alguns animais estavam com fraqueza e andar cambaleante. Passadas mais seis horas, 10 animais estavam mortos e outros 20 em decúbito lateral. Após 48 horas do fornecimento da ração, havia 50 mortos e, aproximadamente, 120 em decúbito lateral. Quando suspeitou-se de algum tipo de intoxicação e a ração fornecida foi retirada. Seis dias após a introdução da nova ração, três animais que ainda apresentavam sinais clínicos, foram eutanasiados para realização de necropsia.

Na visita realizada à propriedade onde estavam os animais sobreviventes ao surto (23 dias pós início da ingestão da ração) observou-se que alguns animais apresentavam apenas uma linha avermelhada (Figura 22) na borda coronária dos cascos e outros com lesões de coloração enegrecida na borda coronária com separação dos cascos (Figura 23).



Figura 22 – Intoxicação por selênio. Suíno do surto 2. 23 dias após a ingestão de ração com excesso de selênio. Borda coronária avermelhada no casco do membro torácico.



Figura 23 – Intoxicação por selênio. Suíno do surto 2. 23 dias após a ingestão de ração com excesso de selênio. Há linha escura na borda coronária dos cascos.

Durante a necropsia dos Suínos 9, 10 e 11 não foram observadas alterações macroscópicas. Após a fixação da medula espinhal, cortes realizados nas intumescências cervicais e lombar revelaram áreas circulares de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro, focos amarelados e áreas deprimidas escuras no corno ventral do H medular do suíno 11 (Figura 24) e, nos suínos 9 e 10 essas áreas eram esbranquiçadas (Figura 25). Os suínos 12, 13, 14 e 15 apresentaram uma linha enegrecida distal à borda coronária e alguns tinham fissuras nos cascos (Figura 26). Os suínos 16 e 17 não apresentaram alterações macroscópicas.



Figura 24 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Áreas circulares amareladas de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro no corno ventral do H medular.



Figura 25 – Intoxicação por Selênio. Surto 2. Suíno 9. Áreas circulares esbranquiçadas de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro no corno ventral do H medular.



Figura 26 – Intoxicação por Selênio. Surto 2. Suíno 14. Após 44 dias da ingestão de ração com excesso de selênio, demonstrando área escura na extremidade nos cascos.

Microscopicamente, as lesões medulares estavam restritas à substância cinzenta do corno ventral. A intumescência lombar foi a mais acometida nos suínos 10 e 11 e não houve diferença na intensidade no suíno 9. A lesão se caracterizava por pequenas vacuolizações no neurópilo (Figura 27). Havia aumento de volume e arredondamento do citoplasma de neurônios. A substância de Nissl estava dispersa da periferia para o centro (cromatólise periférica) (Figura 28) e, por vezes havia desaparecimento total da substância de Nissl (cromatólise total) (Figura 29), ora com núcleos deslocados para a periferia ou ausentes. Alguns neurônios estavam diminuídos de tamanho, sem núcleo e com citoplasma levemente eosinofílico e homogêneo (Figura 28), muitas vezes cercadas por células da glia, ou havia neurônios fragmentados com infiltrado de macrófagos (Neuronofagia) (Figura 30), perda neuronal na região. Nos suínos 10 e 11 foi observada grande quantidade de neurônios extremamente grandes, com citoplasmas volumosos, eosinofílicos com leve vacuolização difusa (Figura 31) e alguns com neuronofagia.

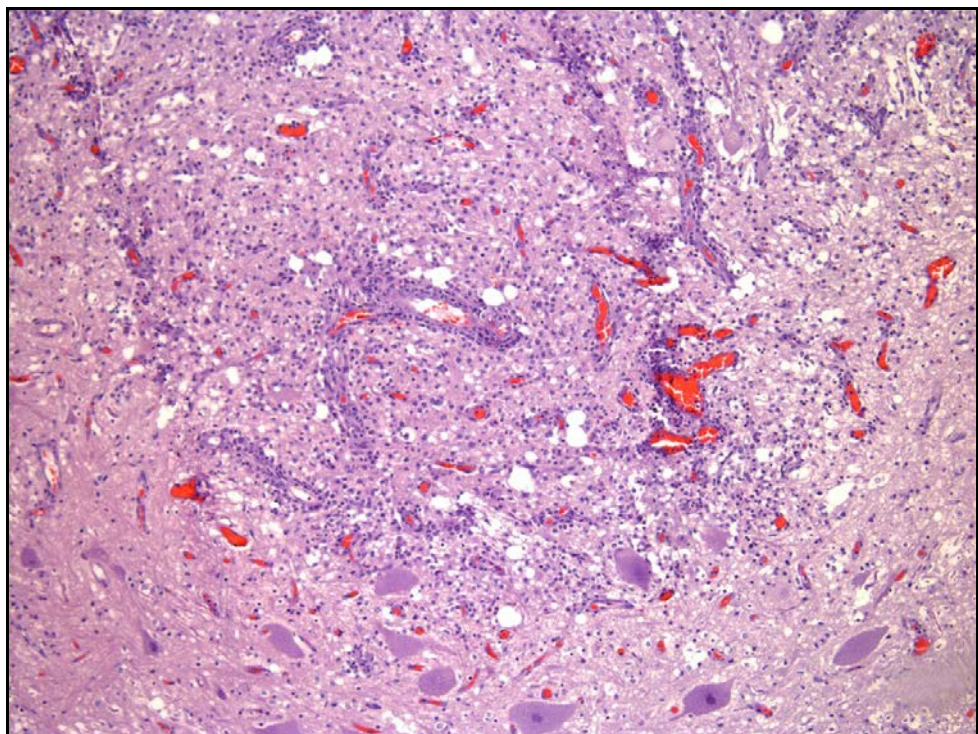


Figura 27 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 9. Intumescência lombar com vacuolização do neurópilo (microcavitações), proliferação endotelial, microgliose e congestão. Hematoxilina eosina, Obj. 10x.

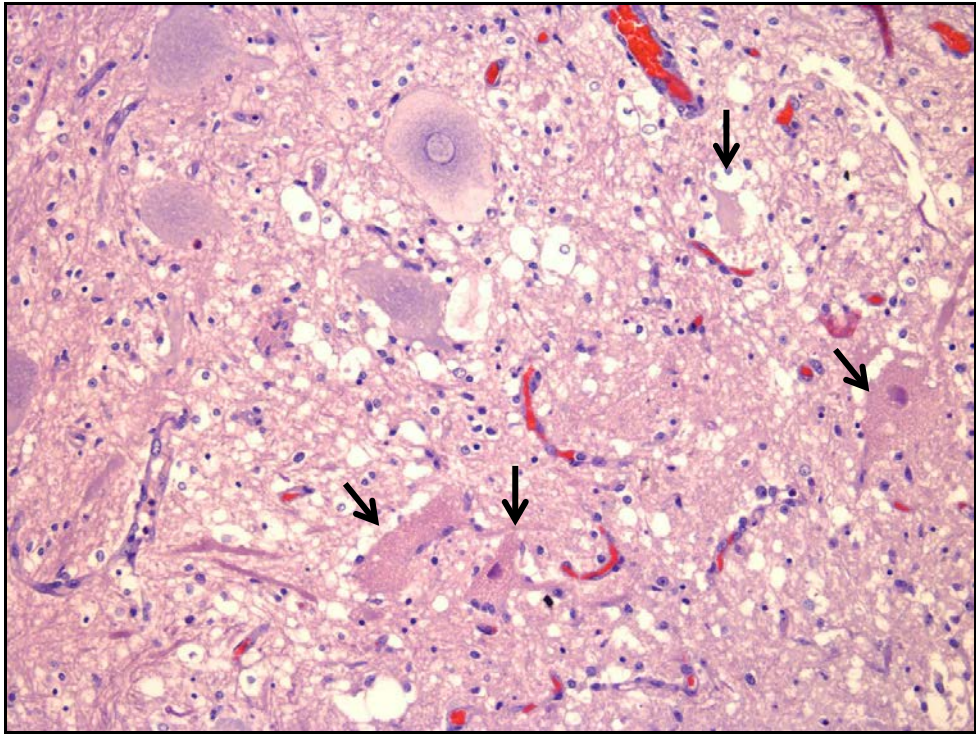


Figura 28 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 10. Intumescência lombar, neurônio com aumento de volume e arredondamento do citoplasma, substância de Nissl dispersa da periferia para o centro (Cromatólise periférica) e alguns neurônios retraídos com citoplasma levemente eosinofílico (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 10x.

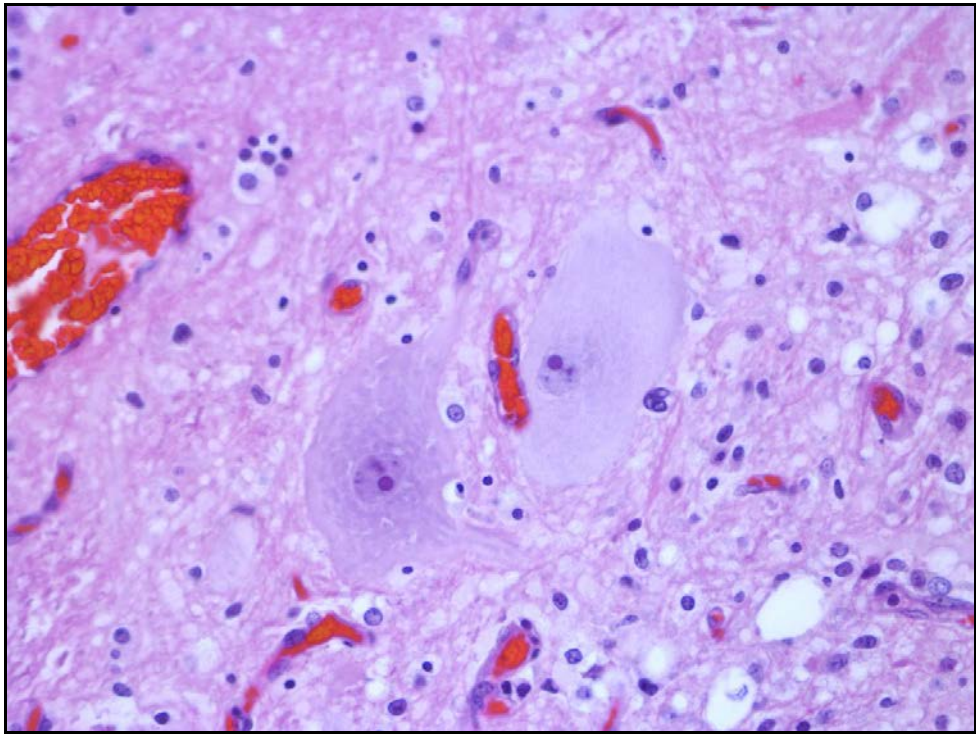


Figura 29 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, neurônio com desaparecimento total da substância de Nissl. Hematoxilina eosina, Obj. 40.

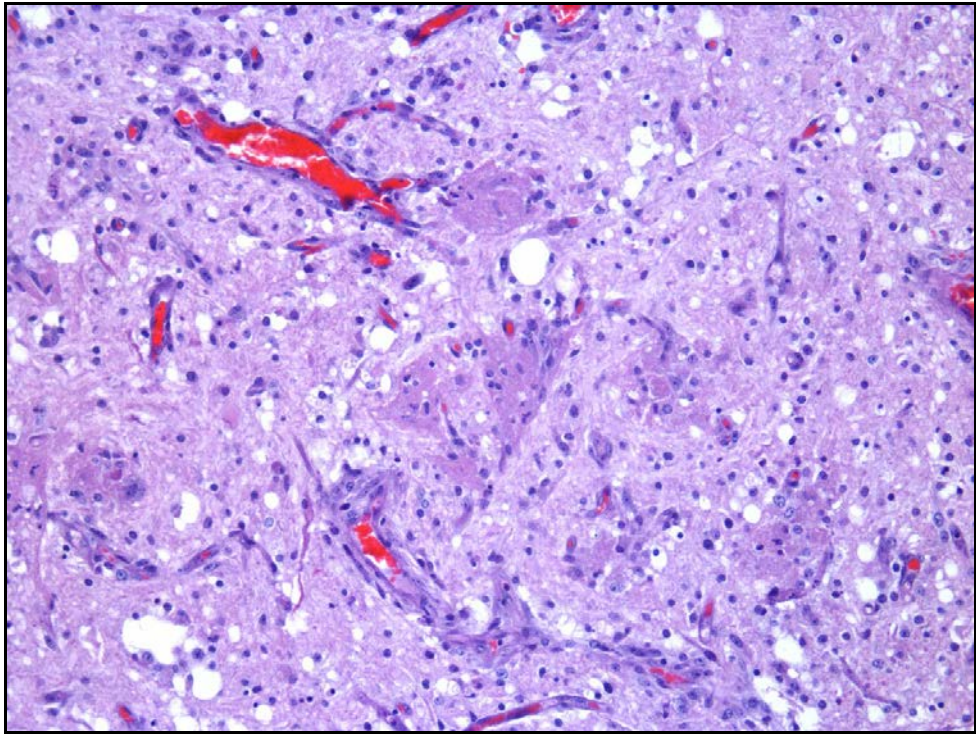


Figura 30 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, neurônios com citoplasma eosinofílico homogêneo, fragmentado com células da glia e células Gitter. Hematoxilina eosina, Obj. 20.

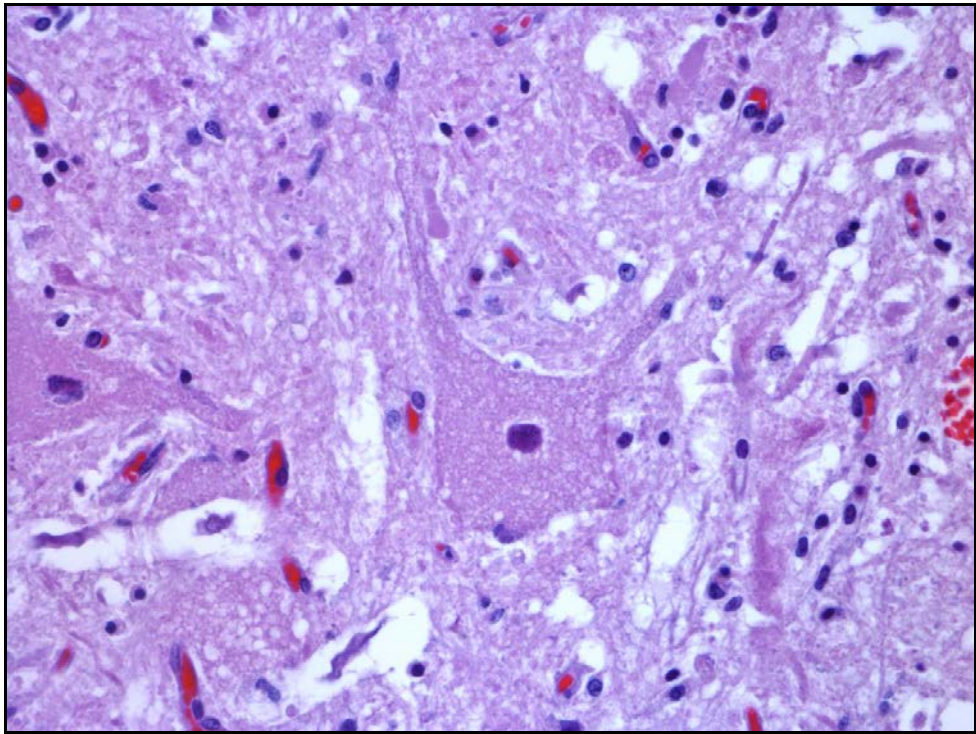


Figura 31 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, neurônio aumentado de tamanho, citoplasma eosinofílico com vacuolização fina. Hematoxilina eosina, Obj. 40.

Foi observada uma microgliose difusa nos focos da lesão, com infiltrado de monócitos com aspecto de macrófagos espumosos (células Gitter) que, submetidos à coloração de PAS, apresentaram grânulos avermelhados no citoplasma. Nos suínos 9 e 11 foi observado infiltrado multifocal leve de eosinófilos (Figura 32). Há também grande aumento no número de vasos, esses ativados (tumefação endotelial), alguns com várias camadas celulares, que foram evidenciados na imuno-histoquímica de von Willebrand (Figura 33). Em alguns animais foram evidenciadas astrogliose e astrocitose leves no foco da lesão pela imuno-histoquímica de GFAP. Foram observados também astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa e nucléolos proeminentes, esses dispostos isoladamente ou em duplas ou trios (Astrócitos de Alzheimer tipo II) (Figura 32, 34), os quais foram positivos na IHQ para Proteína S100 (Figura 35) e negativos para GFAP (Figura 36). Em alguns casos, havia pequenos focos de hemorragia (Suínos 9 e 10). Não foram observadas alterações na substância branca. No tronco encefálico do suíno 11 havia lesões semelhantes às observadas nas intumescências, afetando os núcleos vermelhos do colículo rostral e núcleo motor do nervo trigêmeo do pedúnculo cerebelar. A distribuição e a intensidade das lesões estão distribuídas na tabela 4 e a distribuição das marcações imuno-histoquímicas e a sua intensidade na tabela 5. Os suínos 12, 13, 14, 15, 16 e 17 não apresentaram lesões microscópicas.

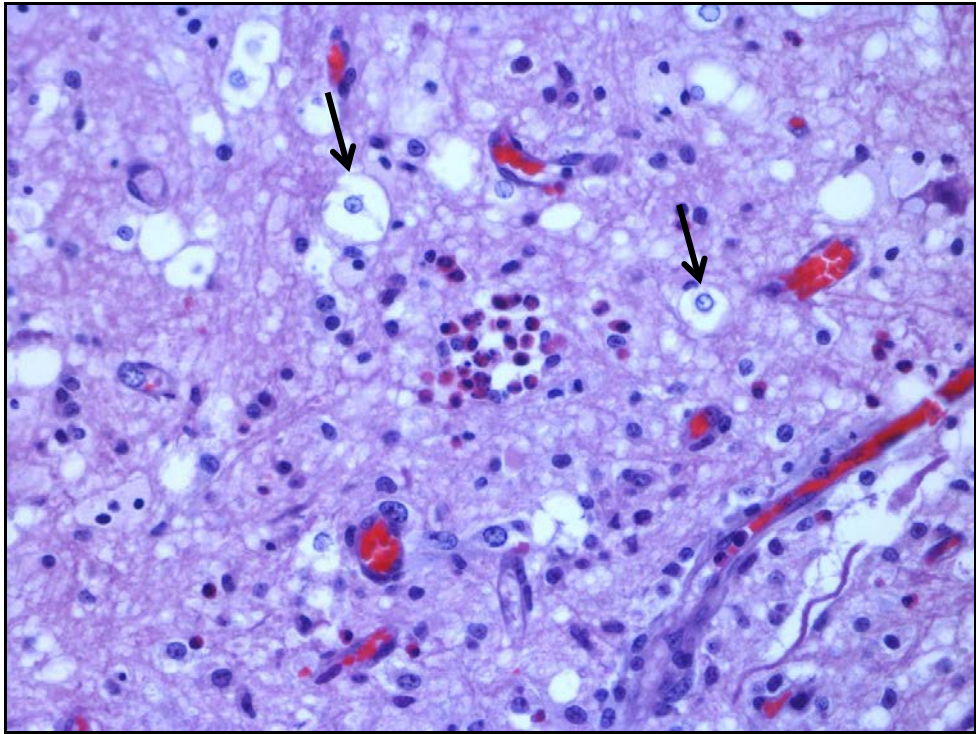


Figura 32 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência lombar, foco de infiltrado de eosinófilos. Astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa (Astrócitos de Alzheimer tipo II) (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40.

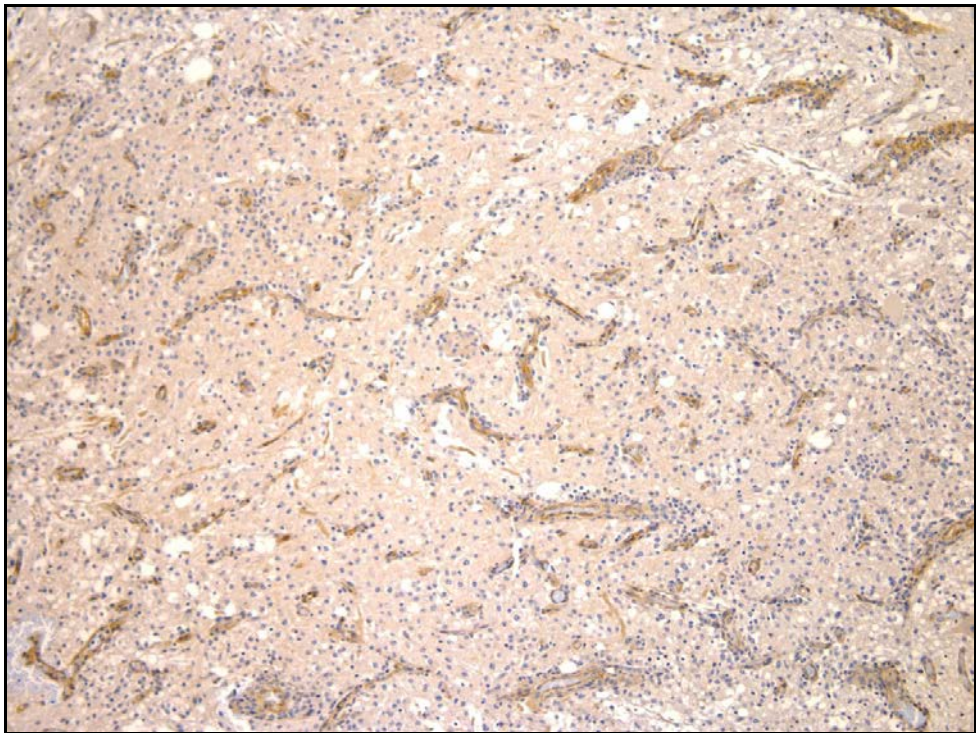


Figura 33 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 9. Intumescência cervical, com marcação positiva para imuno-histoquímica de von Willebrand. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3'-diaminobenzidina, Obj. 20.

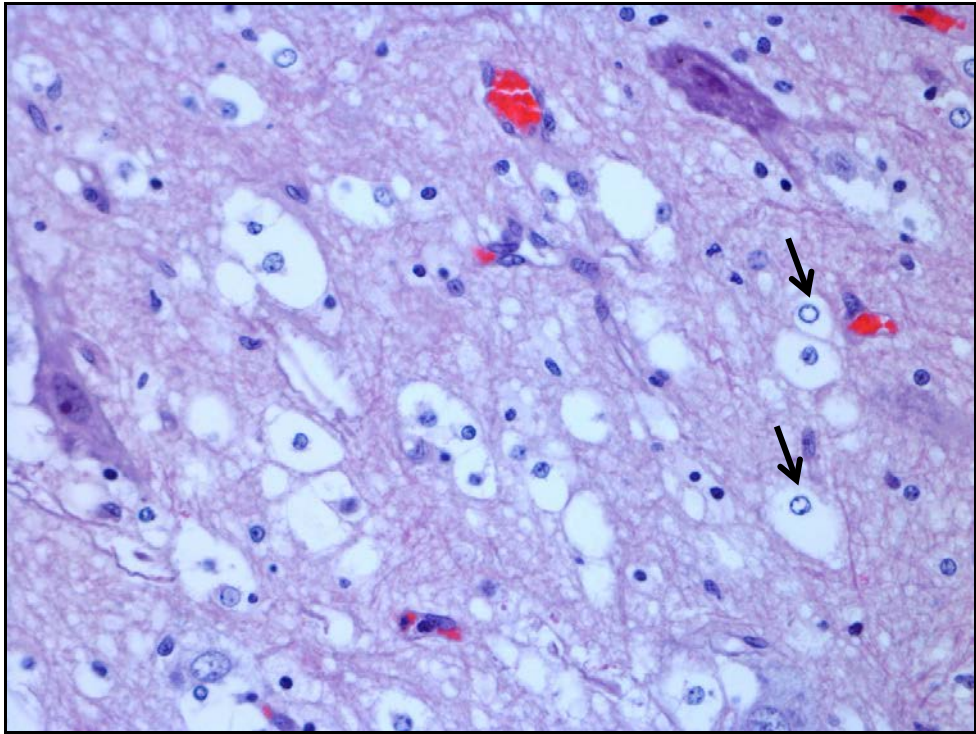


Figura 34 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 10. Intumescência lombar Astrócitos com tumefação nuclear, cromatina dispersa (Astrócitos de Alzheimer tipo II) (setas). Hematoxilina eosina, Obj. 40.

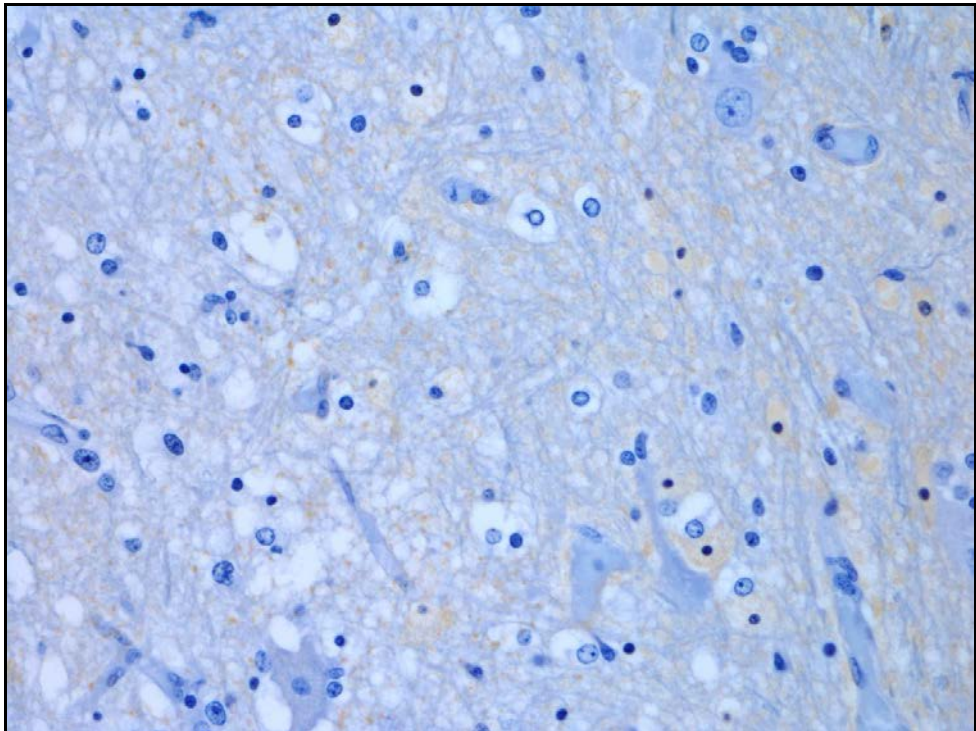


Figura 35 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 10. Intumescência lombar, astrócitos tumefeitos, não marcados na imuno-histoquímica para GFAP. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno 3,3-diaminobenzidina, Obj. 40.

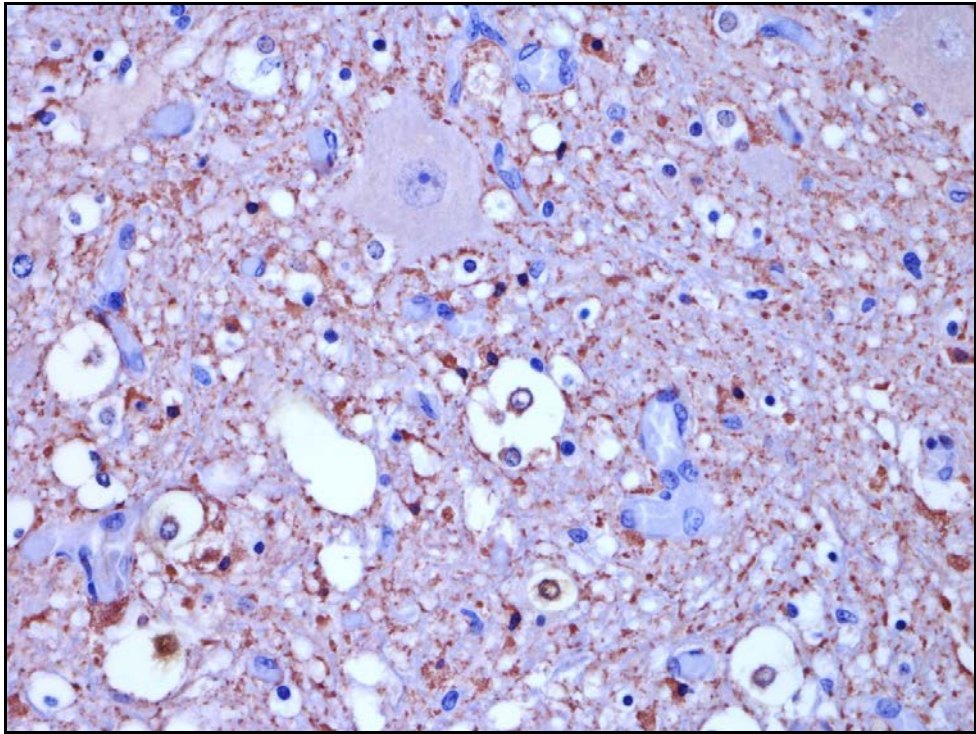


Figura 36 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Suíno 11. Intumescência cervical, astrócitos tumefeitos, marcados na imuno-histoquímica para proteína S-100. Método da estreptavidina-biotina, cromógeno VECTOR[®]NovaRED, Obj. 40.

Tabela 4– Intoxicação por Selênio. Surto 2. Distribuição e intensidade das lesões histológicas e na intumescência cervical da medula espinhal especificamente.

Suíno	Localização	Células Gitter	Microgliose	PE	Eosinófilos	AAII	Cromatólise	Neuronofagia	RNN	VCN	MC	Hemorragia	PN
Suíno 9	IC	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	0	+	+	++
	IL	+++	++	+++	+	0	++	++	++	0	+	0	++
Suíno 10	IC	+	+	++	0	0	++	++	+++	++	0	+	++
	IL	+	+	++	0	++	+++	+++	++	++	+	+	++
Suíno 11	IC	+	++	+++	0	++	++	+++	++	++	++	++	++
	IL	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	0	++
	Pedúnculo Cerebelar	+	+	+	+	+	+	++	0	0	++	0	+
	Colículo Caudal	+	++	+++	0	++	++	+	+	++	+	0	+

C (Porção Cervical), IC (Intumescência Cervical), T (Porção Torácica), L (Porção Lombar), IL (Intumescência Lombar), P (Ponte), PE (Proliferação Endotelial com hipertrofia e hiperplasia), AAII (Astrócitos Alzheimer tipo II), RNN (Restos de Neurônios Necróticos), VCN (Vacuolização em Citoplasma de Neurônios), MC (Microcavitações), PN (Perda Neuronal). Intensidade da lesão: 0 = ausente, + = leve, ++ = moderada, +++ = acentuada.

Tabela 5 – Intoxicação por selênio. Surto 2. Distribuição das marcações imuno-histoquímicas.

Suíno	Localização	Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP)	S-100	von Willenbrand
9	IC	0	0	+++
	IL	0	0	+++
10	IC	+	+	++
	IL	+	++	++
11	IC	+	++	+++
	IL	+	++	+++
	Pedúnculo Cerebelar	+	+	+
	Colículo	+	++	+++

Na análise de selênio foram encontrados 154 mg de Se/ kg da ração fornecida aos animais que adoeceram. Os resultados da análise dos fígados refrigerados estão representados na tabela 6. Na tabela 7 estão os resultados da análise em músculo e algumas vísceras dos animais após 42 dias do surto de intoxicação. Esses animais foram eutanasiados para monitoramento e decisão do destino final do lote intoxicado.

Tabela 6 – Dosagem de selênio em amostras frescas de fígado e ração dos animais do surto 2.

Identificação	Dosagem de Selênio (mg de Se/ kg)
Suíno 9	7,11
Suíno 10	10,0
Suíno 11	5,42

Tabela 7 – Dosagem de selênio em mg/kg nas amostras frescas de fígado, rim, coração, intestino, músculos do pernil, paleta e lombo, dos suínos intoxicados (suínos 12, 31, 14 e 15) e controle (suínos 16 e 17) em mg de Se/ kg.

Animal	Fígado	Pernil	Paleta	Lombo	Intestino	Coração
Suíno 12	1,53	0,85	0,82	0,71	3,4	3,03
Suíno 13	1,35	0,73	0,63	0,64	3,36	2,88
Suíno 14	1,48	0,67	0,7	0,81	3,17	3,0
Suíno 15	1,45	0,63	0,76	0,78	3,08	3,14
Suíno 16	1,42	0,79	0,74	0,73	3,17	2,96
Suíno 17	1,73	0,95	0,74	0,73	3,28	3,01

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de poliomielomalácia simétrica focal causada pela intoxicação por selênio nesse trabalho foi baseado no conjunto de dados epidemiológicos, clínicos, patológicos e na análise de espectrometria atômica quantitativa de selênio. Os achados clínicos e patológicos dos surtos aqui descritos são compatíveis com resultados de intoxicação espontânea e experimental por selênio em suínos (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; CASTELL et al., 1985; WILSON et al., 1988; WILSON et al., 1989; SAFORD, 1990; STOWE et al., 1992; SCHULTZ; JAMES; HAFFMANN, 1995; PANTER et al., 1996; PENRITH; ROBINSON, 1996; BANHOLZER; HEINRITZI, 1998; DAVIDSON-YORK et al., 1999; CASTEIGNAU et al., 2006; NATHUES et al., 2010). Os achados histológicos sugerem um diagnóstico provável de intoxicação por selênio, pois o excesso de ingestão de selênio é a única causa conhecida de poliomielomalácia simétrica focal em suínos (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; WILSON et al. 1988).

A dosagem de selênio em amostras de ração e órgãos de animais afetados completa o diagnóstico de intoxicação por esse microelemento. Os níveis de selênio nas rações do surto 1 e 2 foram, respectivamente, 3,9 e 154 mg/kg. De acordo com alguns autores (MAHAN; MOXON, 1984; KIM; MAHAN, 2001a; CARSON, 2006), o nível mínimo necessário para causar intoxicação é de 5ppm na ração, com desenvolvimento de quadros crônicos com lesões nos cascos e na pele nos animais. O aparecimento de lesões medulares necessitam, pelo menos, 10 ppm de selênio na ração (CARSON, 2006). No surto 1, com apenas 3,9 ppm, os animais desenvolveram lesões de poliomielomalácia e de casco. Acredita-se que a ração não seria homogênea e os animais acabaram ingerindo grandes quantidades de selênio.

Nos suínos 1 ao 11, além de apresentarem poliomielomalácia simétrica focal, os níveis de selênio eram superiores a 3,34 ppm nas amostras de fígado. O menor nível considerado tóxico é 3 ppm em amostras de fígado e rim (CARSON, 2006). Após 42 dias da retirada da ração os animais apresentaram níveis hepáticos de selênio inferiores a 1,73 ppm, o que difere dos achados de Davidson-York et al. (1999) que, após 72 dias da retirada da ração com excesso de selênio, ainda detectou um animal com nível de 3,3 ppm de Se no fígado. Para músculo, os níveis considerados normais são de 0,08 a 0,5 ppm (DAVIDSON-YORK et al., 1999). Com base nesses dados, todos os animais, inclusive os que, sabidamente, não consumiram níveis altos de selênio, estariam com

acúmulo desse mineral nos músculos. Após 60 dias da retirada da ração com altos níveis de Se, os animais apresentaram quantidades normais de selênio no músculo (DAVIDSON-YORK et al., 1999). Como os níveis de selênio hepático estavam abaixo de 3 ppm e os animais iam ser abatidos após 70-80 dias do surto de intoxicação, os animais foram destinados ao consumo.

No presente estudo não se notou correlação entre altos níveis de selênio no fígado e a severidade das lesões histológicas, achados semelhantes aos da literatura (PANTER et al., 1996; DAVIDSON-YORK et al., 1999).

A porcentagem de animais com paralisia nos surtos variou de 15 a 16%, dados semelhantes foram descritos (DAVIDSON-YORK et al., 1999), mas há variação de 2,8 (HARRISON et al. 1983) a 100% (NATHUES et al., 2010).

Os sinais clínicos descritos em ambos os surtos são semelhantes aos descritos por outros autores. Esses eram caracterizados por surgimento abrupto de ataxia dos membros pélvicos, rigidez, progressão para paresia, tetraparesia, decúbito, ausência de febre, estado de alerta inalterado e ingestão normal de comida e água (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; CASTEEL et al., 1985; WILSON et al. 1988; STOWE et al., 1992; SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995; PENRITH; ROBINSON, 1996; CARSON, 2006; CASTEIGNAU et al., 2006; NATHUES et al., 2010). Os animais do surto 2 apresentaram depressão e dispneia (PENRITH; ROBINSON, 1996) e o suíno 8 apresentou andar rígido e arrastamento das pinças (STOWE et al., 1992).

Surto com as manifestações clínicas da poliomielomalácia e de lesões de casco são descritos também por outros autores (HARRISON et al., 1983; CASTEEL, 1985; PANTER et al., 1996; DAVIDSON-YORK et al., 1999; CASTEIGNAU et al., 2006). A redução no consumo demonstrada pelos animais do segundo surto também foi relatada em animais com altos níveis de selênio na ração (MAHAN; MOXON, 1984; SANFORD, 1990; PENRITH; ROBINSON, 1996; HÉLIE; SAUVAGEAU, 1998; KIM; MAHAN, 2001a). A paresia e a paralisia observadas nos suínos podem estar relacionadas às lesões simétricas presentes, em graus variáveis, nos cornos ventrais da medula espinhal, principalmente, em intumescências cervical e lombar, a que está associada com paralisia de neurônio motor inferior (DE LAHUNTA, 2009).

No surto 2, após 30 horas do fornecimento da ração contendo 154 ppm de Se alguns animais começaram a manifestar andar cambaleante e, com 48h, já havia animais em decúbito lateral ou mortos. O aparecimento súbito de sinais e morte em poucas horas

após a introdução da ração contendo 56,8 ppm de selênio, descrito também por Nathues et al. (2010). O início da manifestação neurológica é variado, dependendo da concentração, da quantidade ingerida, da duração da exposição e da fonte de origem do selênio. São relatados surtos após seis semanas da introdução da ração (CASTEEL et al., 1985). Sabe-se que o selênio inorgânico produz lesões mais rápidas e mais severas do que o selênio orgânico, porém este último apresenta maior armazenamento em órgãos (PANTER et al., 1996).

Os achados macroscópicos mais importante são áreas circulares amareladas deprimidas e mais escuras nos cornos ventrais do H medular e a lesão dos cascos, alterações que nem sempre estão presentes. Quando presente, há inicialmente um avermelhamento na borda coronária, esta se torna enegrecida e pode ocorrer o desprendimento do casco (HARRISON et al., 1983; CASTEEL et al., 1985; BANHOLZER; HEINRITZI, 1998; HÉLIE; SAUVAGEAU, 1998; DAVIDSON-YORK et al., 1999; KIM; MAHAN, 2001a; CASTEIGNAU et al., 2006). Após a fixação da medula e corte podem ser encontradas áreas circulares de malácia bilateral, restritas ao corno ventral do H medular (HARRISON et al., 1983; SANFORD, 1990; DAVIDSON-YORK et al., 1999; MAXIE; YOUSSEF, 2007). As lesões são confinadas às intumescências, o que já está descrito (HARRISON et al., 1983; SANFORD, 1990). Por isso o exame macroscópico da medula deve ser feito com cuidado e é importante examinar todas os segmentos medulares e, principalmente, as intumescências cervical e lombar.

Após a confecção da lâmina de medula para microscopia ótica, ao ser colocada sobre um fundo branco, permite observar algumas áreas pálidas circulares nos cornos ventrais do H medular (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983). No surto 2, foi possível observar essas áreas também em colículo e pedúnculo cerebelar.

Além da poliomiélomalácia simétrica focal pode se observar ao exame histológico polioencefalomalácia simétrica focal, com lesão em núcleo motor de trigêmeo e facial, núcleos cuneiformes e grácil, formações reticulares e, ocasionalmente, em núcleo pontino, núcleo olivar, colículo caudal e núcleo cerebelar (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995; CASTEIGNAU et al., 2006; NATHUES et al., 2010). Foram encontradas alterações em formação reticular da ponte (suíno 8), núcleos vermelhos do colículo rostral e núcleo motor do nervo trigêmeo do pedúnculo cerebelar (suíno 11) do tronco encefálico.

Em cinco animais a intumescência lombar foi a mais acometida (Suínos 1, 2, 3, 10 e 11); em três não houve diferença na intensidade (Suínos 5, 6 e 9); em dois a intumescência cervical foi a mais acometida (suíno 4 e 7) e, em um animal (Suíno 8), a porção cervical foi a mais acometida, demonstrando variação na severidade das lesões medulares. Alguns autores descrevem lesões mais severas em intumescência lombar do que na intumescência cervical (HARRISON et al., 1983; WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; CASTEEL et al. 1985; WILSON et al., 1988; SANFORD, 1990; STOWE et al., 1992; PENRITH; ROBINSON, 1996; DAVIDSON-YORK et al., 1999)

Os achados microscópicos encontrados em ambos os surtos são semelhantes aos descritos na literatura. Os eventos iniciais aparentemente são a vacuolização do neurópilo, degeneração e necrose de células da glia e tumefação e ativação endotelial, acompanhadas por alterações cromatólicas em neurônios motores. A proliferação endotelial é proeminente no neurópilo necrótico, e macrófagos aparecem e transformam-se em células Gitter. Um infiltrado de poucos eosinófilos é comum (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995).

A vacuolização difusa do citoplasma de neurônios observado em dois animais (Suínos 10 e 11), não foi relatada em animais intoxicados por selênio. Os neurônios são as células mais sensíveis do sistema nervoso central. Vacúolos podem estar relacionados à resposta neuronal frente a uma lesão. A necrose neuronal é caracterizada por degeneração hidrópica, tumefação de mitocôndrias, picnose e fragmentação do núcleo e lise celular (ZACHARY, 2009). Os vacúolos foram encontrados em neurônios com aumento de tamanho e citoplasma levemente eosinofílico. Essa vacuolização caracteriza uma fase inicial da lesão neuronal. A cromatólise vista nos neurônios pode indicar uma agressão direta a ele (RECH, 2007).

Microgliose, células Gitter e neuronofagia ocorrem, pois as células da microglia são as primeiras a reagir a uma agressão, incluem hiperplasia, hipertrofia, fagocitose dos restos celulares, mielina e neuronofagia, ajudando a coordenar os eventos inflamatórios do sistema nervoso central. Quando ocorre necrose do tecido há um influxo de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos com fagocitose de restos ricos em lipídeos e se tornam macrófagos espumosos denominado também de células Gitter (ZACHARY, 2009).

As únicas alterações astrocitárias observadas em surtos de intoxicação por selênio foram o aumento no número dessas células, astrocitose (COSTA et al., 2011) e

astrócitos tumefeitos (SCHULTZ; HOFFMANN, 1995). É provável que esses astrócitos sejam semelhantes aos observados em alguns animais do presente estudo, apresentam tumefação nuclear, cromatina dispersa com nucléolos proeminentes, denominados então de astrócitos de Alzheimer tipo II. Essas células eram negativas na imuno-histoquímica (IHQ) de GFAP e positivas na IHQ para proteína S-100. Células com essas características histológicas e imuno-histoquímicas são descritas em casos de encefalopatia hepática em equinos (BANDARRA et al., 2011) e polioencefalomalácia em suínos intoxicados por sal e privação de água (FINNIE; BLUMBERGS; WILLIAMSON, 2010). A perda seletiva de filamentos de GFAP relacionada na encefalopatia hepática (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995; ZACHARY, 2009) e na intoxicação por sal (FINNIE; BLUMBERGS; WILLIAMSON, 2010), pode ser o evento que ocorreu nos casos aqui descritos. A astrocitose pode ocorrer para reparação do dano tecidual, há aumento e replicação astrocítica e abundante proliferação dos processos celulares astrocíticos contendo filamentos intermediários compostos por GFAP (ZACHARY, 2009), com isso é possível inferir que os animais que possuíram marcação acentuada na IHQ para GFAP estavam em processo de reparação do dano tecidual.

Estágios lesionais finais são caracterizados pelo desaparecimento total de neurônios e neurópilo e os capilares parecem flutuar em meio às células Gitter com áreas de cavitações e degeneração Walleriana é encontrada nas raízes ventrais (WILSON; SCHOLZ; DRAKE, 1983; SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995). Achado semelhante ocorreu no suíno 8 que apresentou acentuada perda de neurônios, neurópilo, intensa proliferação de células endoteliais, evidenciadas na IHQ de von Willebrand, lesão em formato de ponte com união entre os cornos ventrais, através da porção ventral da comissura cinzenta na porção cervical da medula. Esse achado também encontrado é descrito por Davidson-York et al. (1999) nas porções cervicais e lombares em 4 animais. Apesar dessa lesão cervical acentuada o suíno 8 não desenvolveu quadros de paralisia. Ele foi eutanasiado após 23 dias do início da ingestão da ração com excesso de selênio. Casos assim também são descritos após 27-79 dias do surto (PENRITH; ROBINSON, 1996; DAVIDSON-YORK et al. 1999). Astrócitos gemistocíticos observados nesse caso não foram anteriormente descritos em casos de intoxicação por selênio. Essas células são marcadas positivamente na imuno-histoquímica para GFAP e são observadas em casos onde há injúria do parênquima, onde a reparação ocorrerá por cicatriz glial (RECH, 2007; ZACHARY, 2009).

É possível que haja alterações nos níveis de niacina nos casos de intoxicação por selênio, pois ambos os elementos são eliminados via rota de metilação, de maneira que o excesso de selênio induz deficiência de niacina (WILSON et al., 1989) com resultante déficit energético, uma vez que derivados da niacina desempenham funções no metabolismo energético (NELSON; COX, 2006). A necrose na substância cinzenta das intumescências sugere uma síndrome de privação de energia (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995), nesses casos, as primeiras células afetadas são os neurônios (ZACHARY, 2009). A vacuolização difusa no citoplasma de neurônios das intumescências, observada nos casos de intoxicação por selênio, pode ser uma resposta inicial dos neurônios ao déficit energético, já que os neurônios motores grandes são responsáveis pela inervação dos membros, exigindo maior aporte energético (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1995). São sugeridos estudos futuros para melhor elucidação da patogenia das alterações neurológicas observadas na intoxicação por selênio.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo apresentaram os achados clínicos e patológicos da intoxicação por selênio em suínos evidenciando a importância desta doença no Brasil.

O selênio é capaz de induzir quadros de polioencefalomalácia simétrica focal, poliomielomalácia simétrica focal em suínos e, em animais que sobrevivem por mais tempo levar ao desenvolvimento de lesões de casco.

O fígado se mostrou um material apropriado para a dosagem de selênio e comprovou a intoxicação nos animais.

As intumescências cervical e lombar são as porções medulares que apresentaram alterações histológicas mais acentuadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DISSI, A. N.; BLAKLEY, B. R.; WOODBURY, M. R. Selenium toxicosis in a white-tailed deer herd. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, p. 70-73. 2010.
- BANDARRA, P. M. et al. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Cannabaceae) em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 991-996, 2011.
- BANHOLZER; E.; HEINRITZI, K. Selenium toxicosis in fattening pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 80, p. 158-162, 1998.
- BOSS, G. S.; WATANABE, T. T. N.; ALMEIDA, P. R.; OLIVEIRA, L. G. S.; PAVARINI, S. P.; ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D. Surto de intoxicação pro sal em suínos em Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 329-332, 2012.
- CARPENTER, J. A.; CHARBONNEAU, G.; JOSEPHSON, G. Tiamulin and narasin toxicosis in nursery pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 13, p. 333-226, 2005.
- CARSON, T. L. Toxic Minerals, Chemicals, Plants and Gases. In: STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.) **Diseases of Swine**. 9th ed. Iowa State University Press: Ames. cap. 60, p. 971-984, 2006.
- CASTEEL, S. W. et al. Selenium toxicosis in swine. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 186, p. 1084-1085, 1985.
- CASTEIGNAU, A. et al. Clinical, pathological and toxicological findings of a iatrogenic selenium toxicosis case in feeder pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 323-326, 2006.
- COSTA, R. C. et al. Intoxicação espontânea por selênio em leitões. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 15., 2011, Goiânia. **Anais**. Goiânia: Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Associação Brasileira de Patologia Veterinária, 2011.
- DAVIDSON-YORK, D. et al. Selenium elimination in pigs after an outbreak of selenium toxicosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 352-357, 1999.

- DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2009. 540 p.
- DESTA, B. et al. Acute selenium toxicosis in polo ponies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 623-628, 2011.
- FAN, A. M.; KIZER, K. W. Selenium: nutritional, toxicologic and clinical aspects. **Western Journal of Medicine**, v. 153, p. 160-167, 1990.
- FAIRBROTHER, J. M.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* Infections. In: STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.) **Diseases of Swine**. 9th ed. Iowa State University Press: Ames. cap. 38, p. 639-674, 2006.
- FINNIE, J. W.; BLUMBERGS, P. C.; WILLIAMSON, M. M. Alzheimer type II astrocytes in the brains of pigs with salt poisoning (water deprivation/intoxication). **Australian Veterinary Journal**, v. 88, p. 405-407, 2010.
- GINN, P.E.; MANSELL, J.E.K.L.; RAKICH, P.M. Skin and appendages. In: MAXIE, M.G. (ed.) **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5th., vol. 1, St. Louis: Elsevier, cap 5, p. 553-781, 2007.
- HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O tegumento. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (ed.) **Bases da Patologia em Veterinária**, 4 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, cap 17, p.1107- 1261, 2009.
- HARRISON, L. H. et al. Paralysis in swine due to focal symmetrical poliomalacia: possible selenium toxicosis. **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 265-273, 1983.
- HÉLIE, P.; SAUVAGEAU, R. A. Chronic selenium toxicosis in growing-finishing pigs in southwestern Québec. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 39, p. 591-592, 1998.
- HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Streptococcal Diseases. In: STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.) **Diseases of Swine**. 9th ed. Iowa State University Press: Ames. cap. 47, p. 769-674, 2006.
- JAMES, L.F.; MAYLAND, H.F.; PANTER, K.E. Selenium poisoning in livestock. In: Billings Land Reclamation Symposium on Selenium in Arid and Semiarid Environments, 1990, Montana: Billings. **Proceedings**. Montana: Billings. 25 mar. 1991, p. 75-79.

- KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 942-948, 2001a.
- KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C. Effect of dietary selenium source, level, and pig hair color on various selenium indices. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 949-955, 2001b.
- KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C. Prolonged feeding of high dietary levels of organic and inorganic selenium to gilts from 25 kg body weight through one parity. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 956-966, 2001c.
- MAHAN, D. C.; MOXON, A. L. Effect of inorganic selenium supplementation on selenosis in postweaning swine. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1216-1221, 1984.
- MARTINS, J. B.; MARTINS, V. M. V.; RIET-CORREA, F.; SONCINI, R. A.; PARABONI, S. V. Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leguminosae) em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, p. 35-38, 1986.
- MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. Nervous system. In: MAXIE, M.G. (ed.) **Jubb. Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5th., vol. 1, St. Louis: Elsevier, cap 3, pp 281-457, 2007.
- MOXON, A. L. Alkali disease or selenium poisoning. **Journal of American Medical Association**, v. 110, p. 2030, 1938.
- MORENO, A. M.; SOBESTIANSKY, J.; MÓRES, J. Intoxicação por minerais, produtos químicos, plantas e gases. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (ed.). **Doenças dos Suínos**, Goiânia: Cânone Editorial, p.463-486 2007.
- NATHUES, H. et al. Peracute selenium toxicosis followed by sudden death in growing and finishing pigs. **Canadian Veterinary Journal**, v.51, p. 515-518, 2010.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios da Bioenergética. In:_____. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. cap. 13, p. 485-515.
- NÉSPOLI, P. B. et al. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental por selenito de sódio em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 109-116, 2001.

- OLIVEIRA, F. N.; RECH, R. R.; RISSI, D. R.; BARROS, R. R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação em suínos pela ingestão de sementes de *Aeschynomene indica* (Leg. Papilionoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 25, p. 135-142, 2005.
- O’SULLIVAN, B.M.; BLAKEMORE, W.F. Acute Nicotinamide Deficiency in the Pig Induced by 6-aminonicotinamide. **Veterinary Pathology**, v. 17, p. 748-758, 1980.
- O’TOOLE, D. et al. Selenium-induced “Blind Staggers” and Related Myths. A Commentary on the Extent of Historical Livestock Losses Attributed to Selenosis on Western US Rangelands. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 104-116, 1996.
- O’TOOLE, D.; RAISBECK, M. F. Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 364-373, 1995.
- PANTER, K. E. et al. Comparative Toxicity of Selenium from Seleno-DL-methionine, Sodium Selenate, and *Astragalus bisulcatus* in Pigs. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 32, p. 217-223, 1996.
- PENRITH, M. L.; ROBINSON, J. T. R. Selenium toxicosis with focal symmetrical poliomyelomalacia in postweaning pigs in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 171-179, 1996.
- PESSOA, C. R. de M. et al. Paralytic rabies in swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 298-302, 2011.
- PROPHET, E. B. et al. **Laboratory Methods in Histotechnology, Armed Forces Institute of Pathology**, Washington: American Registry of Pathology, 1992. 279p.
- RAYMUNDO, D. **Estudo comparativo das clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2010. 72f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- RECH, R. R. **Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis**, 2007. 170 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Univesidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- SALLES, M. W. S. et al. Porcine teschovirus polioencephalomyelitis in western Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 367-373, 2011.

- SANFORD, S. E. Selenium toxicosis causing focal symmetrical poliomyelomalacia in pigs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 393-394, 1990.
- SCHULTZ, G. L.; HOFFMANN, J. E. Acute feed-related selenium toxicosis in weaner pigs: A case report. **Swine Health and Production**, v. 3, p. 22-23, 1995.
- STOWE, H. D. et al. Selenium toxicosis in feeder pigs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 292-295, 1992.
- STRUGNELL, B. W.; PAYNE, J. H.; MATTHEWS, R. Selenium toxicosis in sheep associated with excessive sodium selenite in a commercial supplement. **Veterinary Record**, v. 167, p. 707-708, 2010.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. St Louis: Mosby, 1995. 526 p.
- WILSON, T. M. et al. Porcine focal symmetrical poliomyelomalacia: experimental reproduction with oral doses of encapsulated sodium selenite. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 83-88, 1988.
- WILSON, T. M. et al. Porcine focal symmetrical poliomyelomalacia: test for an interaction between dietary selenium and niacin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 454-461, 1989.
- WILSON, T. M.; DRAKE, T. R. Porcine focal symmetrical poliomyelomalacia. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, p. 218-220, 1982.
- WILSON, T. M.; SCHOLZ, R. W.; DRAKE, T. R. Selenium toxicity and porcine focal symmetrical poliomyelomalacia: Description of a Field Outbreak and Experimental Reproduction. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p. 412-421, 1983.
- ZACHARY, J. F. Sistema Nervoso. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (ed.) **Bases da Patologia em Veterinária**, 4 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, cap 14, pp.833-971, 2009.