

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**INTOXICAÇÃO POR ERVILHACA (*Vicia villosa*) EM BOVINOS:
CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS**

Amaro Francisco Viero Silveira

PORTO ALEGRE

2017/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**INTOXICAÇÃO POR ERVILHACA (*Vicia villosa*) EM BOVINOS:
CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS**

Autor: Amaro Francisco Viero Silveira

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientadora: Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2017/2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro lugar à minha família. Pai , Mãe, Irmã, vocês indispensáveis na minha vida. Sou grato também aos meus antepassados, pois é por causa deles que minha família prosperou.

Lembro também dos meus amigos do grupo MOFA: Natan, Georg, Emanuel, Alexandre, Rafael e Pablo. Essa turma é muito engraçada e muito me fizeram rir sozinho pela faculdade. Não menos importantes, lembro também do pessoal do conclave: Luiz, Richard, Iuri, Lucas, Leandro e Júlia: gracias pelos memoráveis conclaves e fins de anos juntos. Não poderia esquecer do pessoal do GRUPO DA RAPAZIADA: há alguns anos iniciamos o pré-vestibular juntos almejando estar nesta universidade. Ao pessoal do Pumas de Futebol Capilé, parceiros de entrar em quadra, porque jogar bola é uma palavra forte.

Agradeço aos professores que cruzaram o meu caminho e deixaram alguma marca na minha trajetória acadêmica. Cito aqui os professores do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS: David Driemeier, Saulo Pavarini e Luciana Sonne: professores competentes e empenhados e com quem aprendi demais nos três anos em que trabalhei com eles. Um agradecimento especial à doutora Luciana Sonne, minha orientadora neste trabalho e nos anos de iniciação científica. Agradeço também às meninas da histologia, Bárbara e Cíntia, pelo auxílio prestado; estendo meus agradecimentos aos meus colegas de estágio na patologia, importantes nas tarefas diárias, e também aos pós-graduandos que de alguma forma ajudaram na minha jornada na patologia. Uma vez SPV, pra sempre SPV.

Aos colegas que tive a honra de conviver e foram muitos, e a alguns que se tornaram amigos: Humberto, Flávio, Marcos, Fernanda (Fê), Muriel e Camila.

Por fim, meu muchas gracias a essa entidade que é Deus, Tupã, Alá, Orixás, seja o nome que tiver , sendo a mesma que rege o mundo mas expressa de diferentes formas.

*“Façam seus jogos senhores, quem se arrisca aprende a manha!
Como é no truco é na vida, quem não aposta não ganha!”
(Pirisca Grecco)*

RESUMO

Ervilhaca (*Vicia* spp.) é uma forrageira cuja ingestão pode acarretar em um quadro clínico conhecido como doença granulomatosa sistêmica. A espécie comumente relacionada a casos de intoxicação é a *Vicia villosa*. O objetivo é descrever lesões macroscópicas e microscópicas e tipo celular envolvido na resposta de bovinos com doença granulomatosa sistêmica. Um estudo retrospectivo foi realizado nos arquivos do setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no período de 2005 – 2016 afim de localizar amostras de pele de bovinos com doença granulomatosa sistêmica associada à ingestão de ervilhaca. Os dados levantados foram sexo, idade e raça. Laudos de necropsia e fotografia dos casos foram consultados para analisar as lesões macroscópicas, suas localizações e frequência de aparecimento. Blocos de parafina contendo amostras de pele foram cortados e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Realizou-se testes imuno-histoquímicos para os anticorpos anti-CD79a (linfócitos B), anti-CD3 (linfócitos T) e anti-CD68 (macrófagos). As lesões macroscópicas, microscópicas e a imuno-marcação foram classificadas em leve (+), moderada (++) e acentuada (+++). Em 8 animais diagnosticados com doença granulomatosa sistêmica relacionada ao consumo de *Vicia spp*, todos eram fêmeas com idade entre 5 e 8 anos (média de 6,6 anos), das raças Holandesa e Jersey. Observou-se alopecia (8/8) e crostas (7/8). As lesões macroscópicas estavam assim distribuídas: cabeça (7/8), membros (5/8). O infiltrado inflamatório variou de leve a moderado (7/7) e foi classificado em: dermatite perivascular leve a acentuada (7/7), perifoliculite leve a moderada (4/7) e estava composto por linfócitos (7/7), macrófagos (7/7) e ocasionais eosinófilos (4/7). Constatou-se também ectasia de glândulas sudoríparas moderada (7/7) e hiperqueratose ortoqueratótica leve a moderada (6/7). Na imuno-histoquímica, foram marcados linfócitos T (CD3) levemente a acentuadamente, macrófagos (CD68) marcando discretamente e os linfócitos B (CD79a) nos quais houve marcações raras ou negativas. Embora haja relato da intoxicação por *Vicia villosa* em bovinos de raças destinadas à produção de carne, nesse estudo os animais acometidos eram de raças destinados à bovinocultura de leite. As lesões de pele da doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de ervilhaca foram observadas basicamente na cabeça, pescoço, tronco e membros. As lesões histológicas mais frequentes foram dermatite perivascular e perifoliculite com infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, macrófagos, ocasionalmente eosinófilos e células gigantes multinucleadas. A imuno-histoquímica mostrou que os linfócitos foram as células mais marcadas.

Palavras-chaves: *Vicia villosa*, imuno-histoquímica, bovino, histopatologia, lesões cutâneas.

ABSTRACT

Hairy vetch (*Vicia spp.*) is a forage whose ingestion can cause a clinical condition known by systemic granulomatous disease. *Vicia villosa* is the species of hairy vetch related to systemic granulomatous disease in cattle. A retrospective study of necropsy and biopsy exams performed between the period of 2005-2016 aiming for cattle with systemic granulomatous disease after consumption of hairy vetch was carried out in the archives of the Setor de Patologia Veterinária from the UFRGS. The data collected were sex, age and breed. Necropsy, reports and photographs of the cases were consulted to analyze macroscopic lesions, their locations and frequency of appearance. Paraffin blocks containing skin samples were cut and stained using hematoxylin and eosin (HE). Polymer immunohistochemical assays were also performed for anti-CD79a (B lymphocytes), anti-CD3 (T lymphocytes) and anti-CD68 (macrophages). Gross and microscopy lesions and immuno-marking were quantified in mild (+), moderate (++), and severe (+++). The diagnosis of systemic granulomatous disease with skin lesions after consumption of *Vicia villosa* was observed in eight cattle. All animals were females, with 5-8 year-old (average 6.6 years), Holstein Friesian cattle (7) and Jersey (1) breeds. Grossly, lesions were characterized by alopecia (8/8), crusts (7/8) and involved the head (7/8) and limbs (5/8). Histology revealed a mild to moderate inflammatory infiltrate (7/7), composed by lymphocytes (7/7), macrophages (7/7), occasional eosinophils, and rare multinucleated giant cells (1/7). It was also classified in mild to severe perivascular dermatitis (7/7), mild to moderate perifolliculitis (4/7). Another findings were moderate apocrine sweat gland ectasia (7/7) and mild to moderate orthokeratotic hyperkeratosis (6/7). Immunohistochemistry of all skin sections had mild to severe staining for T cell (CD3), mild staining for macrophages (CD68), and immunostaining was rare (4/7) or absent (3/7) for B cells (CD79a). Although there is a report of the occurrence of *Vicia villosa* poisoning in beef cattle, in the present study the affected animals were dairy cattle. Most of the skin lesions of systemic granulomatous disease due to the consumption of vetch were observed more frequently in the head, neck, trunk and limbs. Histologically, these consisted of perivascular dermatitis, and perifolliculitis with an inflammatory infiltrate composed predominantly by lymphocytes, macrophages, with occasional eosinophils and multinucleated giant cells. Immunohistochemistry demonstrates a marked immunostaining for T cells.

Keywords: bovine disease, *Vicia villosa*, immunohistochemistry, histology and skin lesions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Doença Granulomatosa sistêmica pelo consumo de <i>Vicia villosa</i>	16
Figura 2	Caracterização histológica e imuno-histoquímica da doença granulomatosa pelo consumo de <i>Vicia villosa</i>	17

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1	Localização e quantificação das lesões macroscópicas de pele em bovinos com a doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de <i>V. villosa</i>	15
Tabela – 2	Testes imuno-histoquímicos para marcadores de linfócitos B, linfócitos T e macrófagos na pele de bovinos com a doença granulomatosa sistêmica.....	15

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3 RESULTADOS.....	14
4 DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÃO.....	21
6 REFERÊNCIAS.....	22

1 – INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Vicia spp.* são plantas leguminosas, herbáceas, trepadeiras, anuais de inverno e conhecidas no Brasil como “ervilhacas” ou “vicas” (CALEGARI *et al.*, 1993)(CALEGARI *et al.*, 1993; TOKARNIA *et al.*, 2012). Possuem raízes profundas e se desenvolvem melhor se puderem escalar outras plantas como pequenas gramíneas (JOST, 1998). As flores estão colocadas pareadamente e podem ter cor violeta-purpúrea ou, raramente branca (PEREIRA *et al.*, 2012). São plantas de clima temperado e subtropical, bem adaptadas ao clima do Rio Grande do Sul e que, quando consorciadas com gramíneas como azevém, centeio ou aveia, produzem mais biomassa pelo hábito de crescimento trepador, além de melhorar a qualidade nutritiva da pastagem para bovinos (PEREIRA *et al.*, 2012).

Embora existam espécies nativas de ervilhaca no Brasil, as de maior interesse econômico são as exóticas, tais como a *Vicia sativa* e a *Vicia villosa* (TOKARNIA *et al.*, 2012). O consumo dessas duas espécies, porém com maior envolvimento da *V. villosa*, ocasionalmente pode levar à ocorrência de intoxicação, podendo esta se apresentar de três formas diferentes possíveis. A primeira diz respeito a alterações agudas de sistema nervoso culminando com morte. A segunda se trata de distúrbios restritos meramente à pele. Já a terceira maneira, e a mais estudada e relatada, é conhecida como doença granulomatosa sistêmica (DGS), e clinicamente está caracterizada por dermatite, prurido, febre, conjutivite, perda de peso e queda na produção leiteira. É descrita em bovinos adultos quase que exclusivamente das raças Holandesa e Aberdeen Angus acometendo diversos órgãos.

Em estudo retrospectivo do período de 1996-2005, das mortes de bovinos causadas por intoxicação de plantas, 2,32% (1/27) foi por ervilhaca (PEDROSO *et al.*, 2007). Foi descrito na Nova Zelândia o primeiro caso de DGS em vacas holandesas adultas, as quais tinham como ingrediente principal na dieta uma planta pertencente à espécie *Brassica*, além de palha e silagem (RAWDON *et al.*, 2017).

No primeiro relato feito de DGS no Brasil causada por *Vicia villosa*, foram acometidos dois rebanhos de vacas predominantemente holandesas localizados no noroeste do Rio Grande do Sul (RS). A pele se apresentava espessa, enrugada, com áreas alopecicas, com pápulas e, devido ao autotraumatismo consequente do prurido, por vezes havia úlceras assim como crostas advindas do líquido amarelado que exsudava da superfície epitelial. O autor ainda encontrou nódulos cinza-pálidos coalescentes multifocais em órgãos como linfonodos, baço, fígado, rins, adrenais e coração (BARROS *et al.*, 2001).

A intoxicação por polpa cítrica (CPT) (*citrus pulp toxicosis*) também leva a uma

doença granulomatosa sistêmica, tendo as mesmas alterações clínicas e patológicas, porém com algumas diferenças epidemiológicas, visto que há relatos de hemorragia em grandes ruminantes que consumiram polpa de citrus na dieta (SAUNDERS *et al.*, 2000).

A patogenia da intoxicação por *Vicia villosa* ainda não é bem elucidada; tem sido proposto a participação da reação de hipersensibilidade do tipo IV; constituintes da ervilhaca seriam absorvidos, atuando como antígenos e estimulando linfócitos, estes por sua vez causariam a doença granulomatosa sistêmica. Houve uma única tentativa bem sucedida de reprodução experimental da doença, contudo, era uma vaca que tinha se recuperado da enfermidade, o que reforça ainda mais o envolvimento da hipersensibilidade tipo IV (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Doravante haja descrições das lesões histológicas na literatura, há poucos relatos das lesões cutâneas correlacionando achados imuno-histoquímicos das mesmas (SONNE *et al.*, 2011). Sendo assim, o objetivo deste trabalho é descrever a epidemiologia, aspectos clínicos e anatomopatológicos das lesões de pele em bovinos afetados pela forma granulomatosa da intoxicação por *V. villosa*, além de aplicar a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para auxiliar na caracterização morfológica das lesões.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, um estudo retrospectivo dos arquivos de exames de necropsia e biópsia do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no período de 2005 – 2016 diagnosticados como doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de ervilhaca. Os casos considerados para o presente trabalho foram bovinos, dos quais foram coletados dados como sexo, idade e raça. Laudos de necropsia e fotografias foram consultados para avaliação macroscópica afim de localizá-las e quantificá-las. Blocos de parafina com amostras de pele foram cortados e corados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

Realizou-se também testes imuno-histoquímicos (IHQ) em cortes histológicos de 3µm obtidos a partir da pele dos bovinos confeccionados em lâminas positivadas (Strar frost Sakura[®]). Para o protocolo de linfócitos T, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 15 minutos em temperatura ambiente; para recuperação antigênica os cortes foram tratados por protease XIV (Sigma) por 15 minutos em temperatura ambiente; para o bloqueio das reações inespecíficas os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico) a 5% diluído em solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 15 minutos em temperatura ambiente; os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo policlonal primário anti-CD3 (DakoCytomation[®], diluição 1/250); os cortes foram incubados com polímero (MACH 4-HRP, Biocare Medical[®]), aplicado também nos demais protocolos; a revelação foi realizada com cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol, InvitroGen[®]) por 15 minutos; as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 20 segundos e montadas com Entellan (Merck[®]). Para os linfócitos B, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 5 minutos em temperatura ambiente; a recuperação antigênica foi realizada com Tris-EDTA pH 9,0 - 96°C durante 20 minutos em panela de pressão (por 500 mL de água destilada na panela); o bloqueio das reações inespecíficas foi executado com leite desnatado a 5% diluído em solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 15 minutos em temperatura ambiente; os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-CD79 (DakoCytomation[®], diluição 1/50); os cortes foram incubados com anticorpo secundário de polímero (MACH 4-HRP, Biocare Medical[®]); na revelação se aplicou o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako[®]); as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 20 segundos e montadas com Entellan (Merck[®]). Já no protocolo de macrófagos, bloqueou-se a peroxidase endógena pela

incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos em temperatura ambiente; a recuperação antigênica foi efetuada com protease XIV (Sigma) por 15 minutos em temperatura ambiente; as reações inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% diluído em solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 15 minutos em temperatura ambiente; incubou-se os cortes *overnight* a 4°C com o anticorpo primário monoclonal anti-CD68 (Dako[®], diluição 1/100); os cortes foram incubados com anticorpo secundário de polímero (MACH 4-HRP, Biocare Medical[®]) revelou-se com cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol, InvitroGen[®]) por 15 minutos; as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 20 segundos e montadas com Entellan (Merck[®]).

A quantificação tanto das lesões macroscópicas, das lesões microscópicas, quanto da imunomarcação foi feita da seguinte forma: ausente (-), leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

3 – RESULTADOS

Durante o período de 2005 a 2016, 8 bovinos submetidos a exames de necropsia ou de biopsia de pele no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS e foram diagnosticados com doença granulomatosa sistêmica associada ao consumo de ervilhaca (*Vicia villosa*) (figura 1A). Esses animais tinham idade média de 6,6 anos, com um intervalo de faixa etária variando entre 5 e 8 anos de idade, sendo 8 fêmeas das raças Holandesa (7/8) e Jersey (1/8). Os casos estavam distribuídos geograficamente da seguinte forma: 75% (6/8) ocorreram na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, 12,5% (1/8) na região nordeste do RS e 12,5% (1/8) aconteceu na região serrana do estado de Santa Catarina. Em 37,5% (3/8) dos animais foi relatado ou observado sinal clínico de prurido, diminuição na produção de leite (7/8), perda de peso (6/8), anorexia (6/8) e hipertermia (2/8). As lesões macroscópicas encontradas foram: alopecia (figura 1B), crostas, liquenificação, descamação e exsudação; a localização e a quantificação destas alterações estão expostas na Tabela 1.

Na histopatologia, somente foram analisadas as alterações de 7 bovinos pois houve a escassez de material de um dos casos. De maneira geral, todos os animais apresentaram infiltrado inflamatório leve a moderado distribuído assim: dermatite perivascular leve a acentuada (7/7) (figura 1C), perifoliculite leve a moderada (57,1%; 4/7) (figura 1D), dermatite superficial (42,8%; 3/7) (figura 1E), foliculite mural moderada a acentuada (28,5% ; 2/7) (figura 1F) e adenite de glândulas sudoríparas (14,2%; 1/7). A composição do infiltrado inflamatório era de: linfócitos (7/7), macrófagos (7/7), eosinófilos (4/7) e células gigantes multinucleadas (1/7). Além de inflamação, outras lesões microscópicas foram observadas, tais como: ectasia de glândulas sudoríparas moderada (7/7) (figura 2A), hiperqueratose ortoqueratótica leve a moderada (85,1%; 6/7) (figura 2B), espongirose leve a moderada (57,1%; 4/7), acantose leve a moderada (42,8%; 3/7), crostas serocelulares leves a acentuadas (42,8%; 3/7), incontinência pigmentar leve (42,8%; 3/7), microabscessos de Munro leves a acentuados (42,8%; 3/7), degeneração hidrópica leve a moderada (28,5%; 2/7), figuras apoptóticas (28,5%; 2/7), úlceras (28,5%; 2/7), edema superficial de derme que variou de leve a moderado (28,5%; 2/7), epiteliotropismo variável (14,2%; 1/7) e erosões (14,2%; 1/7). A marcação das imuno-histoquímicas estão apresentadas na Tabela 2 e na Figuras 2C e D.

Tabela 1. Localização e quantificação das lesões macroscópicas de pele em bovinos com a doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *V. villosa*.

	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4	Bovino 5	Bovino 6	Bovino 7	Bovino 8
Alopecia	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+
Crostras	+++	++	+	++	+	+	++	-
Liquenif. Descamação	-	+	-	-	-	+	++	-
Exsudação	+	++	-	-	-	-	-	-
Localização	a,b,e,f	a,b,c,d, e	a,g	a	a,c,d,f	a,b,c,d	a,b,d,f, g	c,d

Liquenif. = Liquenificação; a=cabeça; b=pescoço; c=tronco; d= membros; e= úbere; f=períneo; g=cauda. - ausência, + discreta, ++ moderada, +++ acentuada. Fonte: próprio autor.

Tabela 2. Testes imuno-histoquímicos para marcadores de linfócitos B, linfócitos T e macrófagos na pele de bovinos com a doença granulomatosa sistêmica.

	CD 79	CD3	CD68
Bovino 1	-	++	+
Bovino 2	Raras	+	+
Bovino 3	Raras	+++	+
Bovino 4	-	++	+
Bovino 5	Raras	++	+
Bovino 6	Raras	+++	+
Bovino 7	-	++	+

- ausência, + discreta, ++ moderada, +++ acentuada. Fonte: próprio autor.

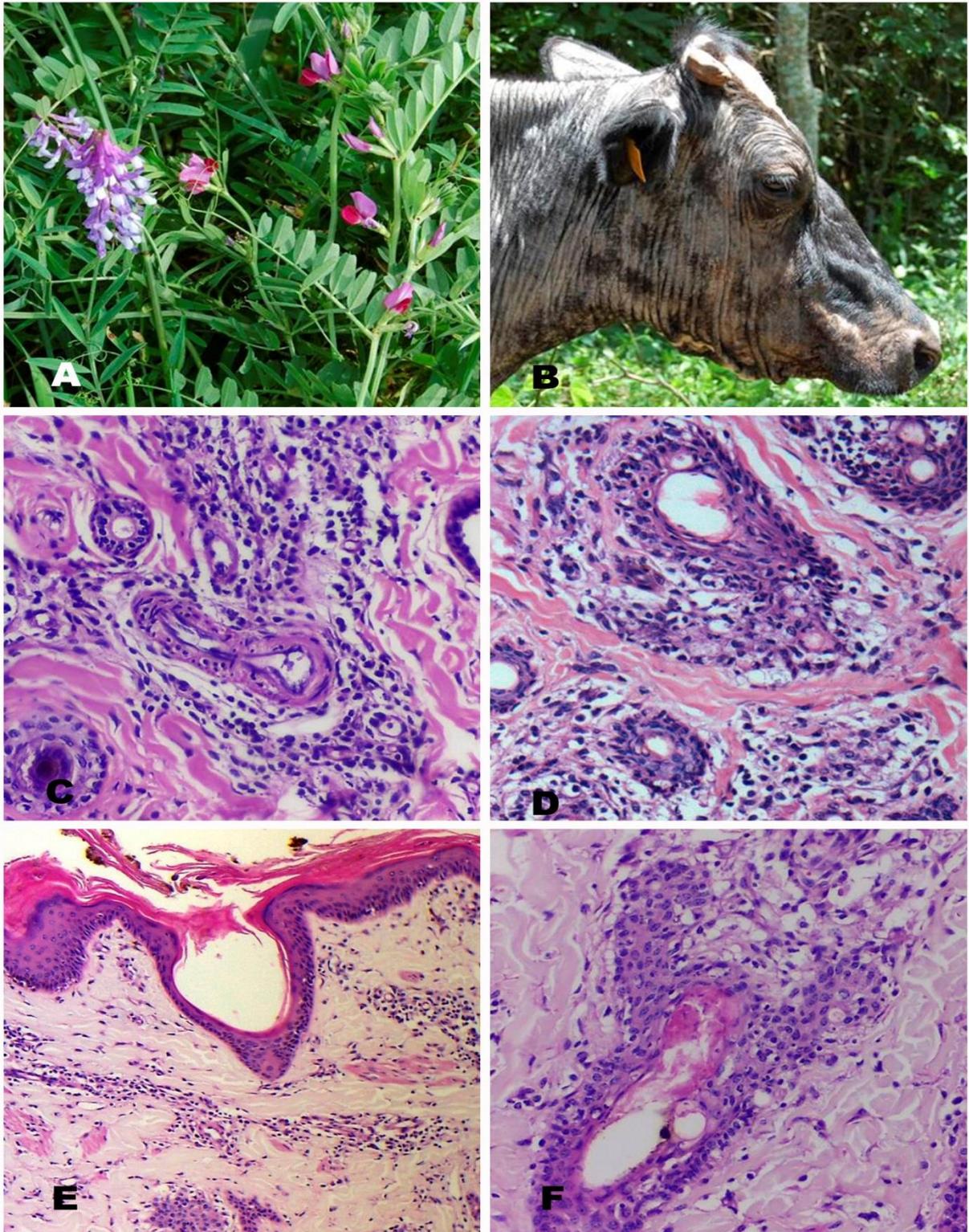


Figura 1. Doença Granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia villosa*. (A) Folhas e flores de *Vicia villosa* à esquerda e *Vicia sativa* à direita. (B) Bovino com acentuada alopecia na cabeça e pescoço. (C) Pele com dermatite perivascular, HE, objetiva de 20x. (D) Pele com perifolliculite, HE objetiva de 20x. (E) Dermatite superficial, HE, objetiva de 10x. (F) Folliculite mural, HE, objetiva de 20x. Fonte: próprio autor.

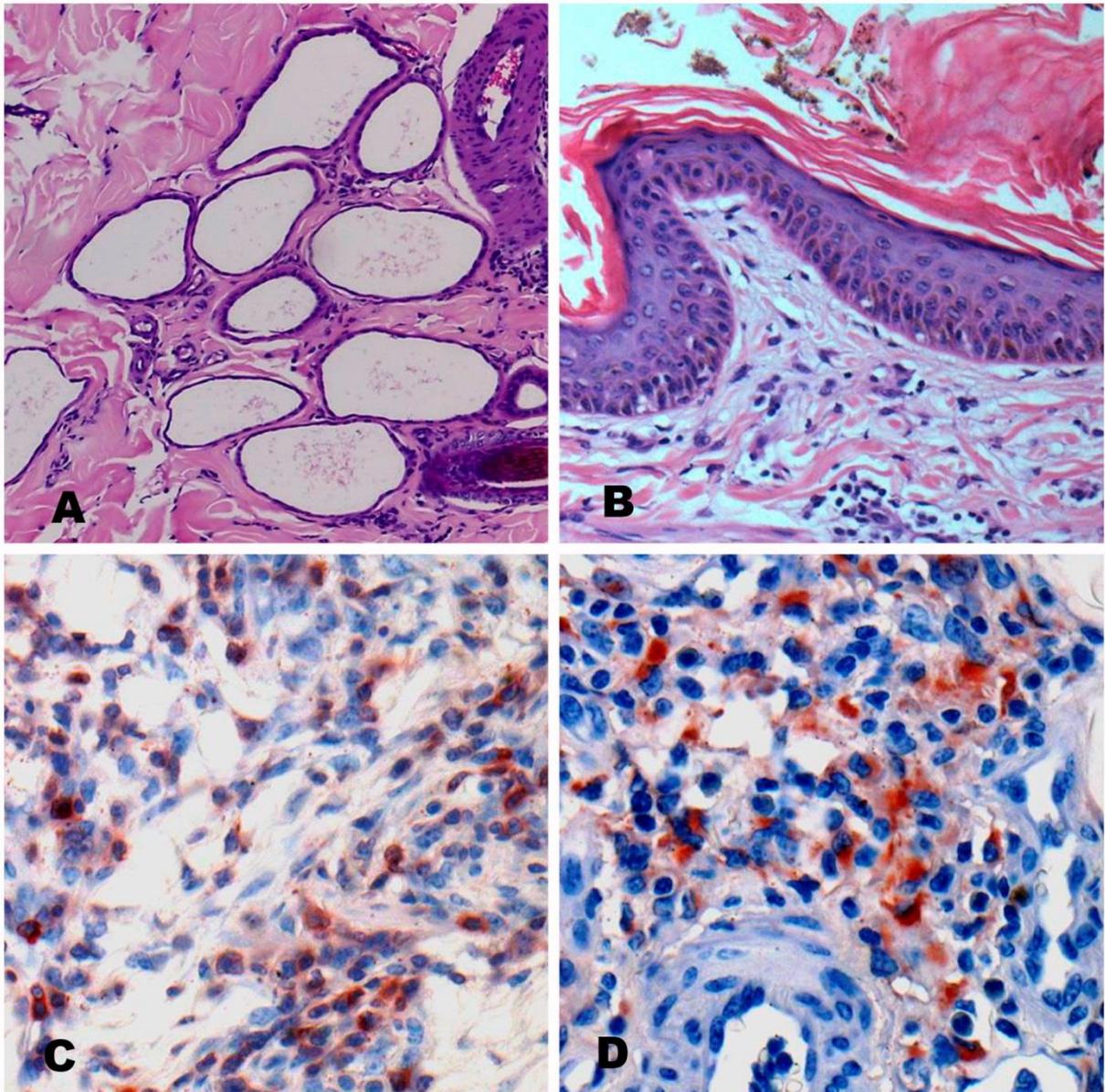


Figura 2. Caracterização histológica e imuno-histoquímica da doença granulomatosa pelo consumo de *Vicia villosa*. (A) Ectasia de glândulas sudoríparas, HE, objetiva de 10x. (B) Hiperqueratose ortoqueratótica, HE, objetiva de 20x. (C) Imuno-histoquímica com marcação positiva para linfócitos T (CD3), obj. 40x (método polímero MACH4, cromógeno AEC). (D) Imuno-histoquímica marcação positiva para macrófagos (CD68), obj. 40x (método polímero – MACH4, cromógeno AEC). Fonte: próprio autor.

4 – DISCUSSÃO

Para o diagnóstico da doença granulomatosa sistêmica associada ao consumo de *V.villosa*, foram considerados os fatores epidemiológicos, os sinais clínicos, alterações anatomopatológicas e achados imuno-histoquímicos. Ainda que os animais do presente estudo fossem todos bovinos adultos, do sexo fêmea, com média de idade de 6,6 anos, há relato na literatura de um equino com sinais clínicos e achados patológicos da enfermidade. Esse era mantido em uma pastagem contendo *Vicia sp.* (WOODS *et al.*, 1992). As raças leiteiras foram as mais presentes neste trabalho, sendo sete vacas holandesas e uma jersey; estas provinham da região noroeste do Rio Grande do Sul, local onde tradicionalmente a pecuária leiteira é praticada e a ervilhaca é muito usada como fonte de proteína fornecida na forma de pastagem. Este fato não exclui bovinos com aptidão para produção de carne de serem susceptíveis à toxicose pela planta. Na Argentina, (ODRIOLOZA *et al.*, 1991) descreveu um surto em 33 touros Aberdeen Angus que apresentaram sinais clínicos e lesões depois de pastarem por 20 dias em um campo que tinha exclusivamente *Vicia villosa*; 5 dias depois de outros 4 bovinos terem os mesmos efeitos, todos foram removidos da pastagem, porém logo alguns começaram a desenvolver dermatite progressiva.

O tempo de evolução das lesões e sinais clínicos é variável (TOKARNIA *et al.*, 2012), tendo neste estudo oscilado entre 5 e 26 dias. Observou-se prurido, diminuição na produção de leite, perda de peso, anorexia e hipertermia. Não foi observado hemorragia, todavia ela pode ocorrer mas menos frequentemente, ao contrário do percebido em grandes ruminantes intoxicados com polpa cítrica, demonstrando o mesmo histórico clínico e epidemiológico dos indivíduos que ingeriram vica (SAUNDERS *et al.*, 2000).

As lesões cutâneas são características marcantes da intoxicação por ervilhaca em bovinos, pois estão associadas ao tempo de ingestão da planta, o qual normalmente é acima de duas semanas (BARROS *et al.*, 2001). Macroscopicamente, as lesões cutâneas são caracterizadas por múltiplas áreas focais a coalescentes de alopecia, liquenificação e descamação, o que confere um aspecto enrugado à pele. Essas características morfológicas cutâneas foram também observadas nos bovinos desse estudo e quando associadas aos dados clínicos e epidemiológicos já permitem um diagnóstico presuntivo de intoxicação por *Vicia spp.*, que acaba sendo confirmatório através da lesão histológica de inflamação granulomatosa. Quanto à distribuição dessas lesões no corpo, não há um consenso entre autores a respeito de onde elas mais acontecem, contudo são principalmente visualizadas na cabeça, pescoço, membros, tronco, úbere, períneo e cauda (BARROS *et al.*, 2001; FIGHERA;

SOUZA; BARROS, 2005; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; SONNE *et al.*, 2011). Alguns autores afirmam que no início do quadro clínico, as alterações de pele aparecem no períneo, úbere, cauda e pescoço. Posteriormente, aparecem na cabeça, tronco e membros (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

Com relação à histopatologia, as alterações mais encontradas neste estudo corroboram com aquelas já descritas anteriormente na literatura, e são: dermatite perivascular, perifoliculite, ectasia de glândulas sudoríparas, hiperqueratose ortoqueratótica e espongiose. Mineralização distrófica do colágeno e acantólise, descritas em um trabalho semelhante, não foram encontradas (FIGHERA; SOUZA; BARROS, 2005). É possível correlacionar a característica da lesão microscópica com o tempo de evolução da doença. Para isso, torna-se importante a caracterização do infiltrado inflamatório (na histologia ou através da IHQ), aliado ao tipo de lesão histológica. Lesões mais iniciais demonstram, geralmente, infiltrado de neutrófilos e acentuado edema dérmico e epidérmico, enquanto que lesões com tempo maior de evolução caracterizam-se por predomínio de células mononucleares e multinucleadas (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

Nesse estudo, observou-se que as alterações cutâneas eram predominantemente crônicas e foram identificadas através do infiltrado preponderante de linfócitos e macrófagos em todos os casos, tanto na histologia, quanto na IHQ. Além disso, outras características que denotaram cronicidade, embora não visualizados em todos os bovinos, foram a presença de ocasionais células gigantes multinucleadas, lesões erosivas e ulcerativas na epiderme e um número ínfimo de casos com edema. Infiltrado de eosinófilos foi observado em quatro casos nesse estudo e constitui um achado histológico frequente nos casos da doença. Alguns autores associam sua presença a quadros mais iniciais da intoxicação (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

Acredita-se que na patogenia desta patologia, haja a participação da hipersensibilidade do tipo IV. Este mecanismo é uma resposta tardia a um estímulo possivelmente causado por alguns constituintes da ervilhaca, que absorvidos, se comportariam como antígenos, sensibilizando linfócitos, fator desencadeador da DGS; sugere-se também que uma lectina da vicia ativaria de forma direta os linfócitos T, e estes dariam início à resposta celular (BARROS *et al.*, 2001; TOKARNIA *et al.*, 2012). Os testes de imuno-histoquímica (IHQ) anti-CD3 deste trabalho mostraram marcada presença de linfócitos T como componentes principais do infiltrado inflamatório dos cortes histológicos de pele; os protocolos anti-CD68 revelaram a infiltração de macrófagos na derme dos animais. O aparecimento desses dois tipos de células (linfócitos T e macrófagos) é mais uma forte evidência de que a hipersensibilidade do tipo IV

está ligada ao mecanismo patológico da intoxicação por *Vicia villosa*, visto que se trata de uma resposta imune celular desencadeada por células mononucleares. A evidência de células gigantes multinucleadas na coloração de hematoxilina e eosina indica a existência de uma ou mais substâncias existentes na planta são persistentemente estranhas (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

5 – CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, bovinos, fêmeas, predominantemente na raça Holandesa, com média de 6,6 anos de idade, representam a categoria mais predisposta para o desenvolvimento de lesões granulomatosas sistêmicas associada ao consumo de ervilhaca. Clinicamente, a doença cutânea se manifestou por intenso prurido, anorexia, diminuição na produção de leite, perda de peso e hipertermia. As alterações macroscópicas apresentaram tempo de evolução de 5-26 dias e foram caracterizadas por alopecia, liquenificação, descamação e exsudação, sendo observadas com maior frequência na cabeça, pescoço, tronco e membros. As lesões histológicas predominantes incluíram dermatite perivascular e perifoliculite com infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, macrófagos, e ocasionalmente eosinófilos e células gigantes multinucleadas. A técnica de imunohistoquímica revelou imunomarcção expressiva para linfócitos T e discreta de macrófagos, o que reforça o envolvimento da reação de hipersensibilidade tardia na patogênese da doença.

6 – REFERÊNCIAS

- BARROS, C. S. L. *et al.* Doença granulomatosa sistêmica em bovinos no Rio Grande do Sul associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia spp*). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 162–171, 2001.
- CALEGARI, A. *et al.* Caracterização das principais espécies de adubo verde. In: **Adubação verde no Sul do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços Projetos em Agricultura Alternativa, 1993. p. 207–330.
- FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Lesões de pele em bovinos com doença granulomatosa sistêmica associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia spp.*). **Ciência Rural**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 406–411, 2005.
- JOST, J. Hairy vetch. **Sustainable Agriculture Management Guides**, [s. l.], v. 3, n. August, p. 1–4, 1998.
- ODRIOLOZA, E. *et al.* An outbreak of *Vicia villosa* (Hairy vetch) Poisoning in Grazing Aberdeen Angus Bulls in Argentina. **Veterinary and Human Toxicology**, [s. l.], v. 33, p. 278–280, 1991.
- PANCIERA, R. J.; MOSIER, D. A.; RITCHEY, J. W. Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) poisoning in cattle: update and experimental induction of disease. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 318–325, 1992.
- PEDROSO, P. M. O. *et al.* Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 35, n. December 2006, p. 213–218, 2007.

PEREIRA, H. *et al.* Leguminosas forrageiras anuais de inverno. In: SERENA, Fontaneli Renato; SANTOS, Henrique Pereira Dos; FONTANELI, Roberto Serena (Eds.). **Forrageiras para Integração Lavoura-Pecuária-Floresta na Região Sul-Brasileira**. 2. ed. Brasília. p. 305–320.

RAWDON, T. G. *et al.* Systemic granulomatous and haemorrhagic syndrome in New Zealand dairy cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 156–162, 2017.

SAUNDERS, G. K. *et al.* Suspected citrus pulp toxicosis in dairy cattle. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 269–271, 2000.

SONNE, L. *et al.* Achados patológicos e imuno-histoquímicos em bovinos com doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia villosa* (Leg. Papilionoideae) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 307–312, 2011.

TOKARNIA, C. H. *et al.* PLANTAS QUE CAUSAM DOENÇA GRANULOMATOSA SISTÊMICA. In: **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2^a Edição ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. p. 431–438.

WOODS, L. W. *et al.* Systemic granulomatous disease in a horse grazing pasture containing vetch (*Vicia* sp.). **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 356–60, 1992.

