

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

**DOENÇA DO ARMAZENAMENTO LISOSSOMAL INDUZIDA PELO
CONSUMO DE *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM HERBÍVOROS
NO RIO GRANDE DO SUL**

PEDRO MIGUEL OCAMPOS PEDROSO

**PORTO ALEGRE
2010**

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

DOENÇA DO ARMAZENAMENTO LISSOSSOMAL INDUZIDA PELO
CONSUMO DE *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM HERBÍVOROS
NO RIO GRANDE DO SUL

Autor: Pedro Miguel Ocampos Pedroso
Tese apresentada como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias, na
área de concentração em Patologia
Veterinária, na Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE
2010

PEDRO MIGUEL OCAMPOS PEDROSO

DOENÇA DO ARMAZENAMENTO LISOSSOMAL INDUZIDA PELO CONSUMO
DE *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM HERBÍVOROS NO RIO GRANDE DO
SUL

Aprovado em 06 de julho de 2010

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Aldo Gava

Membro da Banca

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros

Membro da Banca

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz

Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais e ao meu Irmão

DOENÇA DO ARMAZENAMENTO LISOSSOMAL INDUZIDA PELO CONSUMO DE *SIDA CARPINIFOLIA* (MALVACEAE) EM HERBÍVOROS NO RIO GRANDE DO SUL¹

Autor: Pedro Miguel Ocampos Pedroso

Orientador: David Driemeier

RESUMO

Descrevem-se os achados epidemiológicos, clínico-patológicos, ultra-estruturais e lectino-histoquímicos de herbívoros intoxicados naturalmente por *Sida carpinifolia* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Este estudo incluiu a elaboração de três artigos. Foi realizado um estudo retrospectivo de intoxicação natural por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul, outro relata pela primeira vez uma intoxicação natural por esta planta em um animal silvestre e o terceiro artigo relata os achados patológicos observados em fetos de fêmeas caprina e bovina que foram intoxicadas experimentalmente e naturalmente respectivamente por *Sida carpinifolia*. No primeiro artigo foram afetados cinco bovinos entre os anos de 2001 a 2008. O quadro clínico foi caracterizado por emagrecimento, incoordenação, dificuldade de locomoção, tremores generalizados, quedas frequentes e morte. Microscopicamente as principais alterações foram vacuolização dos neurônios de Purkinje do cerebelo, vacuolização das células acinares do pâncreas e das células foliculares da tireoide. No segundo artigo, o cervídeo desenvolveu uma síndrome neurológica caracterizada por fraqueza muscular, tremores de intensão, déficit visual, quedas, postura e comportamento anormal. Os principais achados microscópicos foram vacuolização citoplasmática nos neurônios de Purkinje do cerebelo. No terceiro artigo duas cabras prenhes foram intoxicadas experimentalmente com *Sida carpinifolia* nas doses de 10 e 13 g/kg respectivamente durante 30 dias e foram acompanhados durante 15 dias após o consumo da planta. Após este período foram eutanasiadas e necropsiadas. Adicionalmente foi incluído um feto bovino no qual a mãe havia sido intoxicada naturalmente por *S. carpinifolia*. As principais alterações microscópicas observadas nos fetos foram vacuolização do epitélio dos túbulos renais, das células foliculares da tireoide e cerebelo com discreta vacuolização dos neurônios

¹ Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias – Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, (77P.). Julho de 2010.

de Purkinje. Na microscopia eletrônica de todos os casos foi observado vacúolos contendo material finamente granulado e delimitado por membrana. Na lectina-histoquímica dos bovinos, do cervídeo e dos fetos observou-se marcação em neurônios com as lectinas *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA) e *Succinyl WGA* (sWGA).

Palavras-chave: *Sida carpinifolia*, doença de depósito lisossomal, bovinos, cervídeo, fetos

LYSOSOMAL STORAGE DISEASE INDUCED BY THE CONSUMPTION OF SIDA CARPINIFOLIA (MALVACEAE) IN HERBIVORES IN RIO GRANDE DO SUL

Author: Pedro Miguel Ocampos Pedroso

Adviser: David Driemeier

ABSTRACT

Describes the epidemiological, clinical, pathological, ultrastructural and lectin-histochemical herbivore naturally poisoned by *Sida carpinifolia* in Rio Grande do Sul, Brazil. This study included the preparation of three articles. We conducted a retrospective study of natural poisoning by *Sida carpinifolia* in cattle in Rio Grande do Sul and the other reports for the first time a natural poisoning by this plant in a wild animal. The third article reports the pathologic findings observed in fetuses of female goats and cattle that were naturally and experimentally poisoned by *Sida carpinifolia* respectively. In the first paper were affected five cattle between the years 2001 to 2008. The clinical picture was characterized by weight loss, incoordination, difficulty walking, generalized tremors, frequent falls and death. Microscopically the main changes were vacuolation of the Purkinje neurons of cerebellum, vacuolization of acinar cells of the pancreas and thyroid follicular cells. In the second paper, the deer developed a neurological syndrome characterized by muscular weakness, intention tremors, visual and standing-up deficits, falls, and abnormal behavior and posture. The main microscopic findings were vacuolation in Purkinje neurons of cerebellum. In the third paper were two pregnant goats experimentally poisoned with *Sida carpinifolia* in doses of 10 and 13 g / kg for 30 days and were followed for 15 days after consumption of the plant. Additionally included a bovine fetus where the mother had been poisoned by *S. carpinifolia*. The main microscopic changes observed in the fetuses were vacuolation of the epithelium of renal tubules, thyroid follicular cells in the cerebellum and mild vacuolation of Purkinje neurons. On electron microscopy all cases was observed vacuoles containing finely granular material and bordered by membrane. In lectin-histochemistry of cattle, the deer and fetuses was observed in neurons marking to lectins *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA) e *Succinyl* WGA (sWGA).

Keywords: *Sida carpinifolia*, lysosomal storage disease, cattles, deer, fetuses.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Enfermidades do armazenamento lisossomal	14
2.2 Alfa-manosidose	15
2.3 Fisiopatogenia das doenças de acúmulo lisossomal	15
2.4 Doenças do armazenamento lisossomal hereditárias	17
2.5 Doenças do armazenamento lisossomal adquiridas	18
2.6 Intoxicação natural por plantas que contém swainsonina em herbívoros	18
2.7 Aspectos botânicos e biológicos de <i>Sida carpinifolia</i>	19
2.8 Epidemiologia	20
2.9 Sinais clínicos	21
2.10 Achados macroscópicos	23
2.11 Achados microscópicos	23
2.12 Microscopia eletrônica de transmissão	24
2.13 Utilização de lectina-histoquímica	24
2.14 Diagnóstico	25
2.15 Diagnóstico diferencial	26
2.16 Tratamento e profilaxia	27
3. ARTIGOS.....	28
3.1 ARTIGO 1	28
3.2 ARTIGO 2	32
3.3 ARTIGO 3	52
4. DISCUSSÃO.....	65
5. CONCLUSÃO	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos envolvidos nas moléstias do armazenamento lisossômico	16
Tabela 2 - Classificação de doenças de depósito lisossomal que envolvem o sistema nervoso de animais	17
Tabela 3 - Lectinas usadas no estudo histoquímico de doenças do depósito lisossomal	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Forma do alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol, swainsonina.	20
--	----

1. INTRODUÇÃO

A *Sida carpinifolia* foi diagnosticada como causa de doença e morte em cabras e equinos (DRIEMEIER *et al.* 2000, LORETTI *et al.* 2003a) e mais tarde na espécie ovina (SEITZ *et al.*, 2005a). Já na espécie bovina há casos diagnosticados desde o ano de 2001 pelo Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS), porém não foram registrados na literatura. No município de Triunfo e municípios próximos, tem sido relatado há anos por parte dos proprietários morte de bovinos como também de ovinos, onde os animais estavam em campos infestados por *S. carpinifolia*. Logo após as mortes dos bovinos os proprietários retiraram o restante dos animais permanecendo nos campos infestados e transferindo-os para outros locais onde não havia a planta, cessando assim com as mortes.

No ano de 2005, foi diagnosticado um caso de doença de depósito lisossomal pelo consumo de *S. carpinifolia* em um cervídeo de Zoológico no município de Sapucaia do Sul, RS. O animal apresentou um quadro clínico caracterizado por depressão, anorexia, letargia, fraqueza muscular, tremores da cabeça e pescoço, decúbito, cegueira, dificuldade em permanecer em estação. Microscopicamente foi observado tumefação e vacuolização no citoplasma de vários tecidos analisados, especialmente nos neurônios de Purkinje do cerebelo, células acinares do pâncreas e células dos túbulos renais (PEDROSO *et al.*, 2009a).

Em estudo retrospectivo sobre plantas que causam intoxicação em ruminantes realizados pelo SPV-UFRGS no período 1996-2005, intoxicação por *Sida carpinifolia* representou 75 % das mortes em caprinos e 24 % na espécie ovina (PEDROSO *et al.*, 2007). A planta encontra-se em abundância em toda região litorânea do Rio Grande do Sul (LORENZI, 2000) e é facilmente consumida pelos animais (COLODEL *et al.*, 2002a), sendo importante seu diagnóstico para evitar gastos com medicamentos e tratamento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enfermidades do armazenamento lisossomal

O lisossomo é o principal centro de eliminação e reciclagem das células (KING & ALROY, 2000). São organelas de formato redondo ou ovalado de 0,2 a 0,8 μm de diâmetro (AGAMOLIS, 1995). Esse corpúsculo cataboliza macromoléculas celulares e extracelulares, gerando aminoácidos, ácidos nucléicos, ácidos graxos e açúcares para reutilização na síntese celular. A degradação de todas as classes de macromoléculas é mediada por grandes quantidades de hidrolases ácidas. Essas enzimas, juntamente com as proteínas secretórias e de membrana plasmática, são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático rugoso e translocadas até o aparelho de Golgi (AG) (KING & ALROY, 2000).

Em seguida, no AG, todas as hidrolases, com exceções da glicocerebrosidase e fosfatase ácida (AGAMOLIS, 1995), são segregadas do restante das proteínas recém sintetizadas pela adição de um resíduo de manose-6-fosfato terminal. Esse resíduo serve como marcador de identificação para receptores específicos (KING & ALROY, 2000). Após a enzima se ligar ao receptor de membrana no aparelho de Golgi, o complexo enzima-receptor deixa essa organela na forma de vesículas onde é recapturado por pinocitose depois de ter-se ligado à membrana plasmática, ou é conduzido até vesículas limitadas por membrana, que se transformam em lisossomos primários. Nesse lisossomo, a hidrolase é liberada de seu marcador pela acidificação do compartimento, fazendo com que a enzima torna-se reativa. Constituintes extracelulares e intracelulares são transportados por fagocitose, endocitose e autofagia para serem catabolizados nos lisossomos. Tão logo as macromoléculas tenham sido catabolizadas, os produtos de degradação são transferidos para o citosol, e provavelmente reutilizados para síntese (AGAMOLIS, 1995; KING & ALROY, 2000).

Normalmente, quase todas as hidrolases lisossômicas estão presentes em níveis de atividade suficientemente elevados, e o acúmulo do substrato, ou seja, doenças de depósito lisossomal, apenas quando a atividade residual está abaixo do limiar crítico de 10 % da atividade enzimática normal (KING & ALROY, 2000).

2.2 Alfa-manosidose

Alfa-manosidose é caracterizada pelo depósito intracelular e excreção urinária de oligossacarídeos contendo manose, ocasionado pela deficiência na atividade da enzima alfa-manosidase (JOLLY *et al.*, 1981). A alfa-manosidose tem sido a doença de depósito lisossomal (DDL) mais importante economicamente para os animais (MAXIE & YOUSSEF, 2007). A doença hereditária foi observada em bovinos da raça Angus e cruzamentos, como Galloway e Murray Grey (JOLLY & WALKEY, 1997; MAXIE & YOUSSEF, 2007). Na Nova Zelândia, aproximadamente 10 % dos bovinos da raça Angus eram heterozigotos para alfa-manosidose antes do início do programa de controle (JOLLY, 1975).

Na espécie bovina é uma doença neurológica hereditária autossômica recessiva, caracteriza-se por um quadro clínico de ataxia, incoordenação, tremores de cabeça, agressividade, fraco desenvolvimento corporal e morte (HEALY *et al.*, 1990; RADOSTITS *et al.*, 2002). Em felinos domésticos foi observada nas raças Short-hair na Inglaterra e Persa na Suíça, Bélgica e na América do Norte (MAENHOUT *et al.*, 1988; JOLLY & WALKEY, 1997; MAXIE & YOUSSEF, 2007), ocorrendo também em seres humanos (OCKEMAN, 1967) e em cobaios (MUNTZ *et al.*, 1999; CRAWLEY *et al.*, 1999).

A alfa-manosidose adquirida ocorre secundariamente à ingestão de plantas que contém o alcalóide indolizidínico swainsonina, como *Astragalus* spp., *Oxytropis* spp., *Swainsona* spp., *Sida carpinifolia*, *Ipomoea carnea* e *Turbina cordata* (COLEGATE *et al.* 1979; DAMIR *et al.* 1987; STEGELMEIER *et al.* 1995; BALOGH *et al.* 1999; COLODEL *et al.*, 2002a; PFISTER *et al.* 2003; DANTAS *et al.* 2006; ARMIEN *et al.* 2007), sendo este princípio ativo um potente inibidor da alfa-manosidase lisossômica. A swainsonina além de inibir a alfa-manosidase lisossomal, também inibe a alfa-manosidase II do aparelho de Golgi, interferindo na produção de oligossacarídeos do tipo complexo, diferindo assim da forma hereditária da alfa-manosidose (JOLLY, 1974; JOLLY & WALKEY, 1997).

2.3 Fisiopatogenia das doenças de acúmulo lisossomal

Disfunções da degradação dos produtos do metabolismo celular normal (substratos) mediadas pelos lisossomos resultam em doenças referidas como doenças de

depósitos lisossomais e o substrato acumulado eventualmente resulta em morte das células afetadas. As doenças de depósito lisossomal foram originalmente suspeitas de se desenvolver exclusivamente por causa das mutações que resultam em uma redução na síntese da enzima lisossomal (ZACHARY, 2009). Atualmente são conhecidos nove diferentes mecanismos causadores de acúmulo lisossomal (Tabela 1) (KING & ALROY, 2000).

Tabela 1 - Mecanismos envolvidos nas moléstias do armazenamento lisossômico

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

Adaptado de: KING & ALROY, 2000.

2.4 Doenças do armazenamento lisossomal hereditárias

As principais doenças do armazenamento lisossomal hereditárias que afetam o sistema nervoso central dos animais estão representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Classificação de doenças de depósito lisossomal que envolvem o sistema nervoso de animais

Doença	Produto armazenado	Enzima deficiente	Espécies
GM ₁ gangliosidase	GM ₁ gangliosídeo	β -galactosidase	Bovina
			Canina
			Felina
			Ovina
GM ₂ gangliosidase	GM ₂ gangliosídeo	β -hexosaminidase	Canina
			Felina
			Suíno
Leucodistrofia celular globoide (doença tipo Krabbe)	Galactosilceramida (galactocerebrosídeo) /galactosilesfingosina (psicosina)	Galactosilceramidase (galactocerebrosídeo β -galactosidase)	Canina
			Felina
			Ovina
α -manosidase	Oligossacarídeo contendo manose	α -manosidase	Bovina
			Felina
β -manosidase	Oligossacarídeo contendo manose	α -manosidase	Caprina
			Bovina
Mucopolissacaridose	Glicosaminoglicanos diferentes	Várias deficiências enzimáticas diferentes	Canina
			Felina
			Caprina
Ceroide-lipofuscinose	Subunidade C da ATPase mitocondrial	Defeito pré-lisossomal?	Canina
			Ovina
			Bovina
Doença de Niemann-Pick tipo C	Gangliosídeo primário nos neurônios	Desconhecida	Ovina
			Bovina
			Felina
			Canina

Adaptado de: ZACHARY. Nervous system. In: McGavin & Zachary. Bases da Patologia em Veterinária. 2009.

2.5 Doenças do armazenamento lisossomal adquiridas

As formas adquiridas da alfa-manosidose podem ser resultantes da ingestão prolongada plantas que contém o alcalóide swainsonina como *Swainsona* spp. (i.e., *S. canescens*, *S. galegifolia*), *Astragalus* spp. (*A. lentiginosus*) e *Oxytropis* spp., mediante a inibição da alfa-manosidase lisossômica. Essa situação também interfere com a síntese normal das glicoproteínas N-ligadas, através da inibição da alfa-manosidase II do aparelho de Golgi (KING & ALROY, 2000).

2.6 Intoxicação natural por plantas que contém swainsonina em herbívoros

Plantas que apresentam o mesmo princípio ativo incluem *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp. e têm causado intoxicação em animais de produção nos Estados Unidos (STEGELMEIER *et al.*, 1995; PFISTER *et al.*, 2003), *Swainsona* spp. na Austrália (COLEGATE *et al.*, 1979), *Ipomoea carnea* no Sudão (DAMIR *et al.*, 1987) e Moçambique (BALOGH *et al.*, 1999), Argentina por *Ipomoea hieronymi* var. *caichaquina* na Argentina (ARMESTO *et al.*, 2004) e por *Sida carpinifolia* (DRIEMEIER *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002a), *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (ARMIÉN *et al.*, 2007), *Ipomoea sericophylla* e *Ipomoea riedelli* (BARBOSA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2007) e *Turbina cordata* (DANTAS *et al.*, 2006), no Brasil.

Os primeiros relatos de intoxicação por plantas do gênero *Astragalus* e *Oxytropis* datam do início do século XVII, e indicam ser estas as primeiras plantas tóxicas associadas com prejuízos aos rebanhos durante a ocupação do Oeste dos Estados Unidos (KINGSBURG, 1964). Cerca de 300 espécies de *Astragalus* e *Oxytropis* foram identificadas nos Estados Unidos, Destas, 13 foram caracterizadas como causadoras de doença neurológica em animais (JAMES & NIELSON, 1988). Essas plantas são conhecidas como *locoweed* e a doença é chamada de *locoism* (MOLYNEUX & JAMES, 1982). A palavra *loco* é originária do espanhol, associado aos sinais neurológicos observados nos animais. As do gênero *Swainsona* são chamadas de “ervilhas-venenosas” (*poison peas*) e os animais que são afetados são chamados de “pea struck” (JAMES *et al.*, 1970).

As intoxicações por plantas que contêm manosídes possuem um caráter crônico e os sinais clínicos aparecem apenas quando os animais ingerem a planta por longos períodos, ou seja, no mínimo por várias semanas.

2.7 Aspectos botânicos e biológicos de *Sida carpinifolia*

Sida carpinifolia L.f. é uma planta Angiospermae da família Malvaceae (LORENZI, 2000), tem como sinonímia *Sida acuta* var. *carpinifolia* (L.f) K. Schum. (KISMANN & GROTH, 2000). É uma planta nativa do Brasil, ocorrendo em quase todo o território nacional (KISMANN & GROTH, 2000). No Brasil, diversas espécies do gênero *Sida* são conhecidas, todas elas possuem em comum o nome vulgar de guanxuma. São descritas as seguintes espécies: *Sida cordifolia*, *S. glaziovii*, *S. linifolia*, *S. paniculata*, *S. micrantha*, *S. urens*, *S. rhombifolia* var. *typica*, *S. rhombifolia* var. *canariensis*, *S. viarum*, *S. spinosa* var. *angustifolia*, *S. spinosa*, *S. santamnensis*, *S. carpinifolia* (LORENZI, 2000).

Sida carpinifolia é conhecida popularmente como guanxuma, vassourinha, malva-brava, malva-baixa, relógio-de-vaqueiro, relógio-vassoura, vassoura-preta, vassoura-tupitixá, tupitixá e tupixá (KISMANN & GROTH, 2000; LORENZI, 2000). Nas regiões de Lajeado e Sapiranga, RS, é vulgarmente denominada chá-da-índia ou chá-do-reino e se encontra disseminada por toda região, mas bastante característica predominando em áreas sombreadas e litorâneas do Rio Grande do Sul.

Planta perene, subarborescente, ereta ou ascendente, ramificada, de caule sublenhoso, com casca fibrosa, com altura de 30-70 cm, propagando-se por meio de sementes. Ocorre em vários tipos de solo, floresce no verão e frutifica até o outono (KISMANN & GROTH, 2000; LORENZI, 2000). É uma planta invasora de lavouras e pastagens, encontradas em solos mais argilosos e compactados e ricos em matéria orgânica (KISMANN & GROTH, 2000; LORENZI, 2000).

Na medicina popular infusões de *S. carpinifolia* são utilizadas como emolientes em afecções respiratórias, como antipirética e tônica (CRUZ, 1982; LUTZENBERG, 1985). Além da swainsonina, também foram isolados da planta ácidos oléico, linoléico, palmítico, esteárico e aracdônico, além de beta-sitosterol, hormônio ecdisteona, rutina, quercitina, saponinas, taninos, cumarinas e flavanóides (LUTZENBERG, 1985; HENRIQUES *et al.*, 1989).

Foi identificado na planta o alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol, denominado swainsonina (Figura 1) (COLODEL *et al.*, 2002b). Esse alcalóide inibe as enzimas α -manosidase lisossomal e α -manosidase II do aparelho de Golgi, induzindo a DDL (AGAMANOLIS, 1995; MOREMEN, 2002), afetando particularmente neurônios, hepatócitos e células acinares do pâncreas (MOLYNEUX & JAMES, 1982; STEGELMEIER *et al.*, 1995). Swainsonina é um alcalóide poli-hidroxiado e solúvel em água, e foi isolado pela primeira vez da planta *Swainsona canescens* (COLEGATE *et al.*, 1979). É também produzida por fungos *Rhizoctonia legumnicola* e *Metarhizium anisopliae* (SCHNEIDER *et al.*, 1983; SIM & PERRY, 1997).

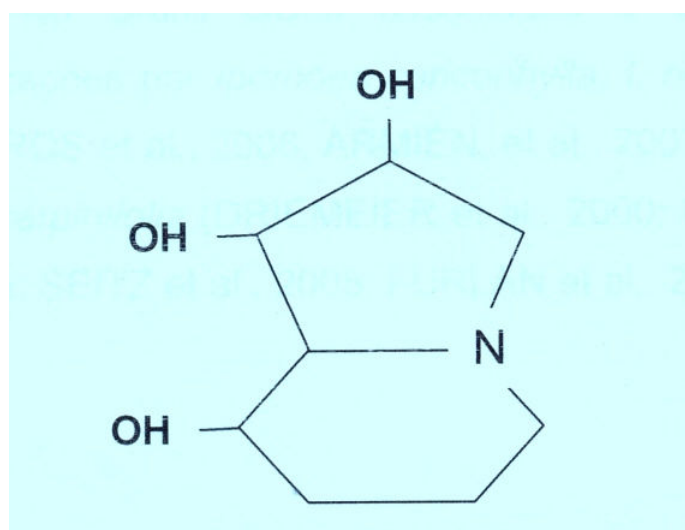


Figura 1 - Forma do alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol, swainsonina.

Fonte: Adaptado de DORLING *et al.*, 1980.

2.8 Epidemiologia

A intoxicação por *Sida carpinifolia* foi diagnosticada pela primeira vez em caprinos no ano de 1997, no município de Lajeado, Rio Grande do Sul. Nesse rebanho havia problemas reprodutivos como abortos e natimortos e animais com sinais neurológicos. Os caprinos pastavam em uma área de aproximadamente cinco hectares infestado por *S. carpinifolia* (DRIEMEIER *et al.*, 2000), logo após no mesmo Estado no ano de 1998, foi diagnosticado a doença neurológica em pôneis que foram introduzidos em um piquete intensamente infestado por *S. carpinifolia*. No piquete havia onze animais, três adoeceram e um morreu com evolução clínica de 24 horas (LORETTI *et*

al., 2003a). No ano de 2001, a intoxicação espontânea em ovinos foi observada no município de Viamão, que apresentavam quadro clínico neurológico (SEITZ *et al.*, 2005a) e também na região central do Rio Grande do Sul (MACÊDO, comunicação pessoal) e em 2005 em cervo dama (*Dama dama*) (PEDROSO *et al.*, 2009a). Na espécie bovina há relatos de intoxicação desde o ano de 2001 a 2008, no qual acometeu cinco animais (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Em Santa Catarina a doença foi observada em seis propriedades de quatro municípios localizados na região do Alto Vale do Itajaí (FURLAN *et al.*, 2009). Também há relatos em São Paulo, afetando caprinos e ovinos (GODOY *et al.*, 2005; PAGANINI FILHO *et al.*, 2008) e, no Rio de Janeiro afetando cervídeos (ANJOS, comunicação pessoal).

Na maioria das propriedades acometidas pode-se observar que *S. carpinifolia* era a vegetação predominante nos piquetes, e portanto, a principal fonte de alimentação dos animais (DRIEMEIER *et al.*, 2000; LORETTI *et al.*, 2003a; SEITZ *et al.*, 2005a; FURLAN *et al.*, 2009; PEDROSO *et al.*, 2009a). Experimentalmente, a doença foi reproduzida em caprinos (COLODEL *et al.*, 2002), ovinos (SEITZ *et al.*, 2005b) e bovinos (FURLAN *et al.*, 2008).

Esta planta que infesta muitos campos na abrangência da grande Porto Alegre, e seus vizinhos, onde há anos tem sido associado com morte de bovinos e ovinos em campos infestados por *S. carpinifolia*.

2.9 Sinais clínicos

O quadro clínico da intoxicação por *S. carpinifolia* observado em herbívoros são semelhantes aos descritos em casos de consumo de plantas do gênero *Swainsona* spp. (COLEGATE *et al.*, 1979), *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp. (STEGELMEIER *et al.*, 1995; PFISTER *et al.*, 2003), também por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (ARMIÉN *et al.*, 2007; ANTONIASSI *et al.*, 2007), *I. Sericophylla*, *I. riedelli* (BARBOSA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2007) e *Turbina cordata* (DANTAS *et al.*, 2007).

Os sinais clínicos observados em ovinos tanto nos casos naturais, como nos experimentais, foram menos evidentes quando comparados aos dos caprinos (COLODEL *et al.*, 2002a). Em ovinos foi observado experimentalmente que o consumo médio diário de 30 g/kg de *S. carpinifolia* secada à sombra é capaz de induzir sinais clínicos de lesões neurológicas, se consumida no período mínimo de 30 dias seguidos (SEITZ *et al.*, 2005b). A planta é tóxica para bovinos, quando ingerida em quantidades

superiores a 10 g/kg, por um período de 120 dias, produzindo sinais clínicos leves. Quando ingerida em doses de 30 e 40 g/kg por um período de 150 dias produz sinais nervosos moderados a severos (FURLAN *et al.*, 2008).

As alterações clínicas consistem principalmente em ataxia com hipermetria (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a; FURLAN *et al.*, 2009), dismetria, tremores de cabeça e pescoço (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a; PEDROSO *et al.*, 2009a), incoordenação (SEITZ *et al.*, 2005a; FURLAN *et al.*, 2009), nistagmo, quedas frequentes, dificuldade em manter estação após a realização do “*head raising test*” (HR test), que consiste em levantar a cabeça do animal, segura-la por um minuto e soltá-la (PIENAAR *et al.*, 1976) e posturas atípicas, muitas vezes os animais se escoram em objetos com os membros cruzados ou sentando-se com os membros pélvicos voltados para trás (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005b). Na espécie bovina, é relatado orelhas voltadas para trás, andar em “marcha”, com passos curtos e pescoço esticado para frente e para baixo, além de dificuldades de transpor obstáculos (FURLAN *et al.*, 2008).

Os animais se movimentam mais lentamente e perda progressiva de peso foi um achado comum em caprinos (COLODEL *et al.*, 2002a), ovinos (SEITZ *et al.*, 2005b) e bovinos (FURLAN *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009). Dificuldade para apreender, mastigar e deglutir os alimentos (SEITZ *et al.*, 2005b), depressão, anorexia, letargia e fraqueza muscular (PEDROSO *et al.*, 2009a) também são relatados.

Em pôneis, relata-se andar rígido, tremores musculares generalizados, sinais de dor abdominal caracterizado por chutes na barriga, rolamento, quedas, decúbito e morte (LORETTI *et al.*, 2003a). Experimentalmente em pôneis intoxicados com dose de 15 g/kg, foi observado tremores de cabeça e pescoço, apatia, sonolência, desequilíbrio e relutância em se movimentar (PEDROSO, dados não publicados).

A doença apresenta curso crônico e os animais podem sobreviver por vários meses após o início dos sinais clínicos. Em caprinos naturalmente intoxicados as mortes ocorreram por causas incidentais como após ataque de abelhas (*Apis mellifera*) e por afogamento (COLODEL *et al.*, 2002a). Em caprinos que permaneceram em observação após o período de consumo da planta, notou-se que os sinais clínicos foram gradativamente reduzindo em intensidade e após quinze dias não se notavam alterações clínicas (COLODEL, 2005).

2.10 Achados macroscópicos

Na necropsia, a ausência de alterações macroscópicas é frequentemente descrita. Em caprinos e ovinos, descreve-se o aumento de volume de linfonodos, principalmente os mesentéricos. Nos demais órgãos, não foram notadas alterações significativas (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a,b). Em pôneis foi observada distensão moderada do ceco e do cólon maior (LORETTI *et al.*, 2003a) e escaras de decúbito em ovinos (SEITZ *et al.*, 2005b).

2.11 Achados microscópicos

As principais alterações microscópicas observadas nos animais são encontradas no sistema nervoso central e caracterizam-se por distensão e vacuolização no pericário de neurônios, mais evidentes nos neurônios de Purkinje do cerebelo, nos neurônios do córtex cerebral, do tálamo, do mesencéfalo, ponte e do corno ventral da medula espinhal (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005a,b; FURLAN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esferóides axonais são frequentemente encontrados na camada granular do cerebelo e, com menor intensidade, em outras áreas do encéfalo e medula espinhal (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a; FURLAN *et al.*, 2009). Em ovinos intoxicados experimentalmente foi observado que alguns dias após cessar o consumo da planta pode haver recuperação clínica dos animais testados e com ausência de lesões em animais levemente afetados (SEITZ *et al.*, 2005b). Em caprinos e ovinos com sinais clínicos acentuados, pode ter recuperação clínica, porém na histologia observa-se eosinofilia citoplasmática, picnose nuclear e o desaparecimento dos neurônios de Purkinje (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005b).

Em um pônei, observou-se distensão e vacuolização de neurônios em todas as áreas do SNC, mas principalmente no mesencéfalo e no tálamo, e além desses, havia vacuolização nas células acinares do pâncreas, células foliculares da tireoide e discreta tumefação do epitélio dos túbulos renais (PEDROSO, dados não publicados). No sistema nervoso periférico, vacuolização foi observada em neurônios do gânglio trigêmeo, gânglio celíaco e no plexo mioentérico do intestino (LORETTI *et al.*, 2003a; FURLAN *et al.*, 2009).

Também há vacuolização no citoplasma das células acinares do pâncreas (DRIEMEIER *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a; FURLAN *et*

al., 2008; FURLAN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; PEDROSO *et al.*, 2009a), das células foliculares da tireoide (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a; FURLAN *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009), no citoplasma de hepatócitos (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005a), em macrófagos de tecidos linfóides (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005a), nos túbulos contornados distais (COLODEL *et al.*, 2002a; LORETTI *et al.*, 2003a; SEITZ *et al.*, 2005a; PEDROSO *et al.*, 2009a) e células epiteliais do epidídimo (FURLAN *et al.*, 2008).

2.12 Microscopia eletrônica de transmissão

As lesões ultra-estruturais são vacuolizações citoplasmáticas, que contêm material finamente granulado, envolto por membrana, principalmente, em neurônios de Purkinje do cerebelo, no citoplasma de hepatócitos, células de Kupffer, células acinares do pâncreas, células foliculares da tireoide e pequenos neurônios da camada granular do córtex cerebelar (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005b). Nessa camada, também observou-se, esferóides axonais preenchidos com corpos densos e corpos túbulo-vesiculares (DRIEMEIER *et al.*, 2000).

2.13 Utilização de lectina-histoquímica

Lectinas são proteínas e glicoproteínas que se ligam seletivamente com resíduos de carboidratos não covalentes. É por esta razão que elas são de interesse e uso em histoquímica, como elas podem ser específicas para localizar monossacarídeos e oligossacarídeos (BROOKS *et al.*, 1997). Lectinas são encontradas em muitos organismos, incluindo vírus, bactérias, e células de animais e plantas. Elas são purificadas por cromatografia de afinidade e, mais recentemente, por técnicas de DNA recombinante (HARTMUT, 1991). As lectinas se ligam de maneira reversível e com alta especificidade a mono e oligossacarídeos, são desprovidas de atividade catalítica e diferente dos anticorpos, pois não são produzidas por uma resposta imune. Cada molécula de lectina possui tipicamente dois ou mais sítios de ligação com carboidrato (BROOKS *et al.*, 1997). As principais lectinas utilizadas em doenças de depósito lisossomal estão identificadas na tabela 3.

Na intoxicação por *S. carpiniifolia* em caprinos, ovinos e cervídeos têm-se identificado marcação com as lectinas *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum*

vulgaris (WGA) e *Succinyl* WGA (sWGA) (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005a; PEDROSO *et al.*, 2009a). A lectina Con-A liga-se mais especificamente a α -manose (GOLDSTEIN & HAYES, 1978) e as lectinas WGA e sWGA marcam os resíduos de β -N-acetil-glicosamina (MONSINGNY *et al.* 1980).

Tabela 3 - Lectinas usadas no estudo histoquímico de doenças do depósito lisossomal

Lectina	Abreviatura	Especificidade Carbohidrato ^a
<i>Concanavalia ensiformis</i>	ConA	α -D-Man; α -D-Glc
<i>Glycine max</i>	SBA	α -D-GalNac; β -D-GalNac; α e β -Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNac
<i>Ulex europaeus-1</i>	UEA-1	α -L-Fuc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNac, NeuNac
<i>Succinyl-WGA</i>	sWGA	(β -(1-4)-D-GlcNac) ²
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D-Gal(1-3) GalNac
<i>Ricinus communis-1</i>	RCA-1	β -D-Gal > α -D-Gal

^a GOLDSTEIN & HAYES, (1978). Fuc: fucose; Gal: galactose; GalNac: N-acetil-galactosamina; Glc: glicose; GlcNac: N-acetil-glicosamina; Man: manose; NeuNac: ácido N-acetil-neuraminico.

2.14 Diagnóstico

O diagnóstico de intoxicação por plantas que contém o princípio ativo swainsonina é fundamentado pelo consumo da planta no local onde os animais estavam, juntamente com a identificação do quadro clínico e lesões histológicas que caracterizam a intoxicação (DRIEMEIER *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002a, FURLAN *et al.*, 2009; PEDROSO *et al.*, 2009a), identificação do princípio ativo (COLODEL *et al.*, 2002b), análise da atividade da enzima alfa-manosidase no plasma (BEDIN *et al.*, 2010) e identificação de oligossacarídeos na urina como diagnóstico “*ante-mortem*” (BEDIN *et al.*, 2009). A utilização da técnica de lectina-histoquímica tem sido utilizada como uma ferramenta de diagnóstico importante em doenças de depósito lisossomal, incluindo aquelas induzidas por plantas tóxicas (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005a; ARMIÉN *et al.*, 2007).

2.15 Diagnóstico diferencial

O quadro clínico e os achados patológicos precisam ser diferenciados de outras doenças. No Brasil tem sido identificado o mesmo princípio ativo e alterações semelhantes às descritas por *S. carpinifolia* nas intoxicações por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (ARMIÉN *et al.*, 2007; ANTONIASSI *et al.*, 2007), *I. sericophylla*, *I. riedelli* (BARBOSA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2007) e *Turbina cordata* (DANTAS *et al.*, 2006).

Duas plantas de interesse pecuário devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de *S. carpinifolia* na região Sul do Brasil, por causarem depósito e com quadro clínico neurológicos que são *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) (Jurubeba) (MENDEZ & RIET-CORREA, 2008) e *Phalaris angusta* (GAVA *et al.*, 1999). *Solanum fastigiatum* apresenta sinais cerebelares caracterizados por crises periódicas do tipo epileptiforme, sendo que a duração varia de poucos segundos a um minuto. Cursa com fina vacuolização celular limitada aos neurônios de Purkinje do cerebelo (RECH *et al.*, 2006; MENDÉZ & RIET-CORREA, 2008). No entanto, com a técnica de lectina-histoquímica elas podem ser diferenciadas, pois na intoxicação por *S. carpinifolia* é caracterizada como uma α -manosidase (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005a) e na intoxicação por *S. fastigiatum* como uma doença de depósito glicolipídico (PAULOVICH *et al.*, 2002).

Na intoxicação por *Phalaris angusta* evidencia-se uma coloração verde-azulada nas regiões do tálamo, mesencéfalo e medula oblonga e na microscopia há pigmento granular marrom-amarelado no pericário de neurônios (SOUZA & IRIGOYEN, 1999).

Doenças infecciosas devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de *S. carpinifolia* em herbívoros como: Raiva e Encefalopatas Espongiformes Transmissíveis, destacando-se o Scrapie em ovinos e caprinos e Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) (BARROS *et al.*, 2006). Na raiva, observa-se incoordenação, paresia e paralisia dos membros pélvicos, decúbito, movimentos de pedalagem e morte, com uma evolução clínica de 3 a 7 dias, e na microscopia observa-se meningoencefalite e meningomielite linfoplasmocitária com corpúsculos de Negri (LANGOHR *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2005; PEDROSO *et al.*, 2009b). Animais acometidos pela BSE sofrem degeneração progressiva do sistema nervoso central e podem apresentar alterações do comportamento, sensibilidade e locomoção. Distúrbios do comportamento incluem nervosismo, medo ou agressividade e postura anormal. Na

microscopia, as lesões são degenerativas, simétricas e bilaterais e se localizam em certas regiões da substância cinzenta do tronco encefálico. Na neurópila e no pericário, há vacúolos de 20 µm e 30-40 µm de diâmetro, respectivamente. Esses vacúolos distendem o pericário, e produzem neurônios com formato balonoso (BARROS *et al.*, 2006).

Deve ser também considerada a intoxicação por *Aspergillus clavatus* que apresenta sinais clínicos como tremores musculares, dificuldade de andar, hipersensibilidade, salivação, paresia e paralisia progressiva (LORETTI *et al.*, 2003b; BARROS *et al.*, 2006; BEZERRA JÚNIOR *et al.*, 2009). Na necropsia, lesões nos músculos esqueléticos são evidentes, mas podem não ser visíveis em bovinos que morrem da doença aguda (BARROS *et al.*, 2006). As principais lesões microscópicas ocorrem no encéfalo e medula espinhal, onde os neurônios afetados estão tumefeitos, com citoplasma arredondado, eosinofílico, vacuolizado ou cromatolítico (LORETTI *et al.*, 2003b; BARROS *et al.*, 2006; BEZERRA JÚNIOR *et al.*, 2009).

2.16 Tratamento e profilaxia

Os animais devem ser retirados de áreas infestadas pela planta. Outras medidas aplicáveis incluem o manejo de pastagens e a utilização de herbicidas apropriados (OSWEILER, 1998; LORENZI, 2000). Desde que animais afetados tendem a se recuperar após cessar o consumo da planta, caso haja interesse em manter a vida de animais afetados, estes devem ser manejados em ambientes seguros contra acidentes e, se necessário, receber suporte endovenoso.

3. ARTIGOS

3.1 ARTIGO 1

Sida carpinifolia (MALVACEAE) POISONING IN FALLOW DEER (*Dama dama*)

Pedro Miguel Ocampos Pedroso, Raquel Von Hohendorf, Luis Gustavo Oliveira,
Milene Schmitz, Cláudio Estevão Farias da Cruz & David Driemeier

ARTIGO PUBLICADO EM JOURNAL OF
ZOO AND WILDLIFE MEDICINE, Volume 40,
número 3, 583-585, 2009

SIDA CARPINIFOLIA (MALVACEAE) POISONING IN FALLOW DEER (*DAMA DAMA*)

Pedro M. O. Pedrosa, Raquel Von Hohenberg, Luiz G. S. de Oliveira, Milene Schmitz, Cláudio E. F. da Cruz, D.V.M., Ph.D., and David Driemeier, D.V.M., Ph.D.

Abstract: A captive fallow deer (*Dama dama*) in a zoo was spontaneously poisoned after consumption of *Sida carpinifolia*. The paddock where cervids were kept was severely infested by *S. carpinifolia*. The deer developed a neurological syndrome characterized by muscular weakness, intention tremors, visual and standing-up deficits, falls, and abnormal behavior and posture. Because a severe mandibular fracture and the consequent deteriorating condition, it was euthanized. Main microscopic findings were swelling and multifocal cytoplasmic vacuolation in the Purkinje cells. The cytoplasm of multiple cells of the cerebellum, especially the Purkinje cells, stained with the lectins *Concanavalina ensiformis*, *Triticum vulgaris*, and succinylated *Triticum vulgaris*. Diagnostic possibilities such as bovine diarrhea virus, rabies, and transmissible spongiform encephalopathy were excluded. The report focuses on the risk of maintaining *S. carpinifolia* populations in zoo enclosures of wild herbivores.

Key words: deer, lysosomal storage disease, lectin histochemistry, poisoning, *Sida carpinifolia*, swainsonine-containing plants

BRIEF COMMUNICATION

The consumption by livestock of plants of the genera *Astragalus* and *Oxytropis* in the United States, *Swainsona* in Australia, and *Ipomoea* in Mozambique and in Brazil has been associated with phenotypes resembling lysosomal storage disorders.^{1,2} In Brazil, the ingestion of *Sida carpinifolia* and *Turbina cordata* also has been reported to produce similar neurological syndromes.^{3,4} Although native to tropical America, *S. carpinifolia* has spread throughout the tropics and subtropics, where it is particularly abundant in humid and reduced sunlight areas. The disease most commonly affects goats but it also affects other species and is caused by the indolizidine alkaloid swainsonine that is an inhibitor of the lysosomal enzyme α -mannosidase.⁵ This condition induces the storage of mannose-containing oligosaccharides in lysosomes of several cells, especially neurons, hepatocytes, and acinar pancreatic cells.⁶ Microscopy may be used to observe the presence of lysosomal storage,⁷ but lectin histochemistry enables its characterization as α -mannosidosis.⁸ The chromatographic detection of urinary oligosaccharides has been demonstrated

as a useful diagnostic tool in *S. carpinifolia* exposure or poisoning.⁹ There are numerous reports of livestock poisoning associated with the consumption of plants from this group; however, little information is available on the subject regarding wild animals.^{10,11} Mechanisms by which wild animals cope with toxic plants have been presented previously.⁶ This communication reports a spontaneous case of *S. carpinifolia* poisoning in a zoo-captive fallow deer (*Dama dama*).

The disease affected only a 2-yr-old female fallow deer out of a group composed of four fallow deer and three Sambar deer (*Cervus urocolor*). Animals were kept in an enclosure (5,089 m²) at the Sapucaia do Sul Zoological Park in Rio Grande do Sul, Brazil. The total diet for the cervid group included 50 kg of green forage (elephant-grass [*Penisetum purpurascens*], maize [*Zea mays*], millet [*Setaria italica*], or oat [*Avena sativa*]), 7 kg of a specially formulated concentrate, 2 kg of diced fruit and legumes, and free access to mineral mix and drinking water. The paddock where animals was kept was infested by *S. carpinifolia* (Fig. 1). The deer exhibited signs of depression; anorexia, lethargy, muscular weakness, intention tremors of the head and neck, recumbence, apparent blindness, inability to stand up, frequent falls, and abnormal behavior and posture. Because a severe mandibular fracture and the continuously deteriorating condition, it was euthanized and necropsied. Scapular lymph nodes had increased size and were hemorrhagic. Fragments from several organs were collected and processed for routine

From the Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia 91540-000, Porto Alegre-RS, Brazil (Pedrosa, Oliveira, Schmitz, Cruz, Driemeier); and The Hospital Veterinário, Parque Zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, BR 116, Sapucaia do Sul-RS, Brazil (Hohenberg). Correspondence should be directed to Dr. Cruz (vetkra@terra.com.br).



Figure 1. *Sida carpinifolia* infestation on the paddock of the cervids at a zoological park. Inset: Detail of *S. carpinifolia*.

histology. Swelling and multifocal cytoplasmic vacuolation in several tissues, especially in the Purkinje cells (Fig. 2A), kidneys, and pancreatic cells, were the main microscopic findings. There were also scarce axonal spheroids in the granular layer from cerebellum and moderate congestion and follicular hyperplasia in scapular lymph nodes. Selected sections from the cerebellum were stained by lectin histochemistry (Vector Laboratories, Burlingame, California 94010, USA) as described previously.⁶ *Concanavalia ensiformis* (α -D-mannose and α -D-glucose), *Glycine max* (α -D-N-acetyl-galactosamine, β -D-N-acetyl-galactosamine and α - and β -galactose), *Dolichos biflorus* (α -D-N-acetyl-galactosamine), *Ulex europaeus*-1 (α -L-fucose), *Triticum vulgare* (β -D-N-acetyl-glucosamine and N-acetyl-neuraminic acid), succinylated *Triticum vulgare* [β -(1-4)-D-N-acetyl-glucosamine], *Arachis hypogaea* [β -D-galactose(1-3)-N-acetyl-glucosamine], and *Ricinus communis*-1 [β -D-galactose > α -D-galactose) were the lectins (and their specific carbohydrates) used in the study. After deparaffinizing, the sections were incubated in 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min at room temperature, rinsed in 0.01 mol/l phosphate-buffered saline, incubated with citrate buffer for 15 min at 100°C, and treated with 5% fat-free milk (Molico®, Nestlé Brasil Ltda., CEP 04583-110 Vila Cordeiro, São Paulo, SP, Brasil) in distilled water for 30 min. Subsequently, they were incubated with lectins at 5 μ g/ml dilution (except for concanavalin A, which was at 1 μ g/ml) overnight, followed by incubation with biotin-streptavidin for 20 min at room temperature. Diaminobenzidine was the chromogen, and Meyer's hematoxylin was used for counterstaining. Sections from a goat affected

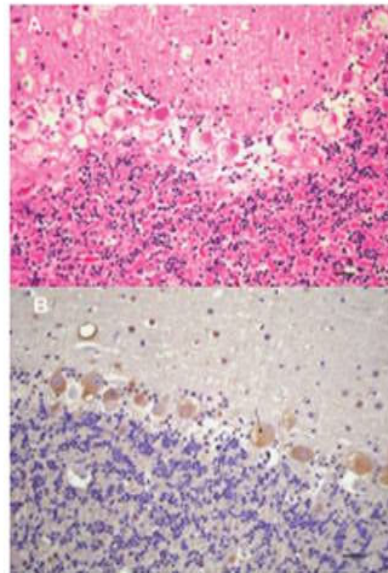


Figure 2. A. Cerebellum of a *S. carpinifolia*-poisoned fallow deer showing swelling and multifocal cytoplasmic vacuolation in the Purkinje cells (arrow), hematoxylin and eosin staining. Bar = 25 μ m. B. Section of formalin-fixed and paraffin-embedded cerebellum of a *S. carpinifolia*-poisoned fallow deer, incubated with *C. ensiformis* and counterstained with Meyer's hematoxylin. As shown within a Purkinje cell (arrow), brown staining indicates lectin binding to α -D-Mannose and α -D-Glucose. Bar = 25 μ m.

by *S. carpinifolia* poisoning served as positive controls. The cytoplasm of multiple cells of the cerebellar granular and molecular layers, but especially Purkinje cells (Fig. 2B), stained markedly with *Concanavalia ensiformis*, *T. vulgare*, and succinylated *T. vulgare*. In addition, selected sections were negative when tested by immunohistochemistry to bovine diarrhea virus, rabies, and transmissible spongiform encephalopathy.

Plant poisoning is of major concern to the livestock industry from many regions of the world, especially those where extensive grazing systems are applied. Although wild animals are regarded as higher adapted than livestock to coping with toxic plants, they may be affected.⁶ However, comprehensively, plant poisoning in wild animals may be overlooked, neglected, or

undiagnosed. Most of the epidemiologic, clinical, histologic, and lectin histochemical findings resembled those seen in cases affecting goats (*Capra hircus*), horses (*Equus caballus*), sheep (*Ovis aries*), and cattle (*Bos taurus*).^{10,11} Although just one animal was affected, comparatively with all those animals diagnosed as affected by *S. carpinifolia* poisoning at our laboratory, vacuolation seemed of higher severity in tissues from this deer. Findings were comparable with those observed in locoism (poisoning by plants of the genera *Astragalus* and *Oxytropis*) in elk (*Cervus canadensis*);¹² however, extensive pancreatic vacuolation in mule deer (*Odocoileus hemionus*) poisoned by *Oxytropis serotina* has been highlighted. Such differences may be associated with species-specific mannosidase expression.¹¹ Although not diagnosed yet in Brazil, chronic wasting disease, an emergent transmissible spongiform encephalopathy of cervids, was a confounding possibility excluded by immunostaining. Factors affecting the consumption of toxic plants by herbivores may include lack of suitable forage, undernourishment, palatability, availability (predominance in the area), and addictive chemical properties of the plants.¹³ Swainsonine-containing plants have been described as some of the most addictive plants to herbivores. A restricted grazing area infested by *S. carpinifolia*, and an unsuitable green forage diet content, even temporarily, along with the addictive behavior usually linked to *S. carpinifolia*¹³ were probably the major predisposing factors involved in this current case. The fracture of the mandibular bone seen in this deer was probably consequent to the falls that the deer had suffered. *S. carpinifolia*-poisoned animals may survive for months until death is triggered by a complication secondary to accidents.¹³ This case concerns an additional neurologic disorder affecting free-living, but especially captive wild animals. These findings also emphasize the risk of allowing the invasion of *S. carpinifolia* populations within zoo habitats, especially because it is unknown whether the plant also causes subclinical impairment.

Acknowledgments: This study was funded by The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil.

LITERATURE CITED

1. Adcock, J. L., and R. E. Keiss. 1969. Locoism in elk. *Bull. Wildl. Dis. Assoc.* 5: 121-124.
2. Barbosa, R. C., F. Riet-Correa, R. M. T. Medeiros, E. F. Lima, S. S. Barros, J. E. Gimeno, R. J. Molyneux, and D. R. Gardner. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea radellii* in goats in the state of Paraíba, northeastern Brazil. *Toxicol.* 47: 371-379.
3. Bedin, M., E. M. Colodel, R. Giugliani, P. Zlotowski, C. E. F. Cruz, and D. Driemeier. 2009. Urinary oligosaccharides a peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning. *Toxicol.* 53: 591-594.
4. Dantas, A. F. M., F. Riet-Correa, D. R. Gardner, R. M. T. Medeiros, S. S. Barros, B. L. Anjos, and R. B. Lucena. 2007. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. *Toxicol.* 49: 111-116.
5. Driemeier, D., E. M. Colodel, E. J. Gimeno, and S. S. Barros. 2000. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in goats. *Vet. Pathol.* 37: 153-159.
6. Fowler, M. E. 1983. Plant poisoning in free-living wild animals: a review. *J. Wildl. Dis.* 19: 34-43.
7. Glew, R. H., A. Basu, E. M. Prence, and A. T. Remaley. 1985. Lysosomal storage diseases. *Lab. Invest.* 53: 250-269.
8. Riet-Correa, F., and M. C. Menezes. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: Riet-Correa, F., A. L. Schild, R. A. A. Lemos, and J. R. J. Borges (eds.), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*, 3rd ed., vol. 2. Pallott, Santa Maria, Brazil. Pp. 99-221.
9. Seitz, A. L., E. M. Colodel, M. Schmitz, E. J. Gimeno, and D. Driemeier. 2005. Use of lectin histochemistry to diagnose *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in sheep. *Vet. Rec.* 156: 386-388.
10. Stegelmeier, B. L., L. F. James, K. E. Panter, and R. J. Molyneux. 1995. Tissue and serum swainsonine concentrations in sheep ingesting *Astragalus lentiginosus* (locoweed). *Vet. Hum. Toxicol.* 37: 336-339.
11. Stegelmeier, B. L., L. F. James, K. E. Panter, S. T. Lee, M. H. Ralph, J. A. Pfister, and T. R. Spraker. 2005. Locoweed (*Oxytropis sibirica*)-induced lesions in mule deer (*Odocoileus hemionus*). *Vet. Pathol.* 42: 566-578.
12. Tokarnia, C. H., J. Döbereiner, and P. V. Peixoto. 2000. *Plantas Tóxicas do Brasil*, 1st ed. Helianthus, Rio de Janeiro, Brazil.
13. Wolfe G. J., and W. R. Lance. 1984. Locoweed poisoning in a northern New Mexico elk herd. *J. Range Manage.* 37: 59-63.

Received for publication 12 February 2009

3.2 ARTIGO 2

**DOENÇA DO ARMAZENAMENTO LISOSSOMAL INDUZIDA PELO
CONSUMO DE *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) EM BOVINOS NO RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL.**

**Pedro Miguel Ocampos Pedroso, Cláudio Estevão Farias da Cruz, Mauro Pereira
Soares, Laura R. B. Barreto & David Driemeier**

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM
PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**



Pesquisa Veterinária Brasileira

Brazilian Journal of Veterinary Research

<www.pvb.com.br> <spvb@pvb.com.br>

DECLARAÇÃO

Declaro que o artigo “**Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul**”, de autoria de Pedro M.O. Pedroso, Luiz G.S. de Oliveira, Cláudio E.F. Cruz, Mauro P. Soares, Laura R.B. Barreto e David Driemeier, foi aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Seropédica/RJ, em 5 de julho de 2010

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.

Trabalho
(Adapt.p.PVB,)

Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul¹

Pedro M.O. Pedroso², Luiz G.S. de Oiveira², Cláudio E.F. Cruz², Mauro P. Soares³,
Laura R.B. Barreto⁴ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Pedroso P.M.O., de Oliveira L.G.S., Cruz C.E.F., Soares M.P., Barreto L.R.B. & Driemeier D. 2010. [Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in cattle in Rio Grande do Sul.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

This paper reports the natural poisoning by *Sida carpinifolia* (guanxuma, chá-da-índia) in cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. Five cattle were affected in the period 2001-2008. Clinical signs included weight loss, incoordination, walking difficulty, generalized tremors, frequent falls, and death. Microscopically, the main changes were vacuolation of Purkinje neurons in the cerebellum, pancreatic acinar cells, and thyroid follicular cells. Transmission electron microscopy revealed vacuoles bordered by membrane containing finely granular material. Lectin histochemistry showed positive staining in neurons with the lectins *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA), and *Succinyl Triticum vulgare* (sWGA).

¹ Recebido em....

Aceito para publicação em....

Parte da tese de doutorado do primeiro autor, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

² Setor de Patologia Veterinária (SPV), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. * Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

⁴ Médica Veterinária da Secretaria municipal da Agricultura de Triunfo, RS.

INDEX TERMS: plant poisoning, *Sida carpinifolia*, cattle, lysosomal storage disease, lectin histochemistry, transmission electron microscopy.

RESUMO.- [Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul] Relata-se a intoxicação natural por *Sida carpinifolia* (guanxuma, chá-da-índia) em bovinos no Rio Grande do Sul. Foram afetados cinco bovinos no período 2001-2008. O quadro clínico foi caracterizado por emagrecimento, incoordenação, dificuldade de locomoção, tremores generalizados, quedas frequentes e morte. Microscopicamente, as principais alterações foram vacuolização dos neurônios de Purkinje do cerebelo, das células acinares do pâncreas e das células foliculares da tireoide. A microscopia eletrônica evidenciou vacúolos com conteúdo finamente granuloso e delimitado por membrana. Na lectina-histoquímica, observou-se marcação em neurônios com as lectinas *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA) e *Succinyl Triticum vulgare* (sWGA).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Intoxicação por planta, *Sida carpinifolia*, bovinos, doença do armazenamento lisossomal, lectina-histoquímica, microscopia eletrônica de transmissão.

INTRODUÇÃO

Sida carpinifolia L.f. (Malvaceae) ou *Sida acuta* var. *carpinifolia* (L.f) K. Schum, popularmente conhecida como guanxuma, vassourinha, malva-brava e relógio-de-vaqueiro é planta nativa do Brasil, onde ocorre em quase todo o território nacional. A planta é invasora de lavouras e pastagens, principalmente em solos mais argilosos, compactados e ricos em matéria orgânica (Kissmann & Groth 2000, Lorenzi 2000). No Rio Grande do Sul, onde é vulgarmente conhecida como chá-da-índia ou chá-do-reino, a planta está disseminada, especialmente em áreas sombreadas e litorâneas. Nesse estado, a intoxicação foi diagnosticada, pela primeira vez, em caprinos (Driemeier et al. 2000), subsequentemente, em pôneis (Loretti et al. 2003), ovinos (Seitz et al. 2005a) e cervo dama (*Dama dama*) (Pedroso et al. 2009). A doença também foi identificada em Santa Catarina, onde foram afetados bovinos (Furlan et al. 2009) e, em São Paulo, onde caprinos e ovinos se intoxicaram (Godoy et al. 2005, Paganini Filho et al. 2008). Experimentalmente, a doença foi reproduzida em caprinos (Colodel et al. 2002a), ovinos (Seitz et al. 2005b) e bovinos (Furlan et al. 2008).

Os principais sinais clínicos da intoxicação incluem incoordenação, ataxia com dismetria, tremores de cabeça e pescoço, além de quedas frequentes (Colodel et al. 2002a, Furlan et al. 2008). Na necropsia, não são observadas alterações macroscópicas significativas (Colodel et al. 2002a, Seitz et al. 2005a, Furlan et al. 2008). As principais alterações microscópicas se caracterizam por distensão e vacuolização dos neurônios de Purkinje do cerebelo, núcleos do tronco encefálico, epitélio dos ácinos pancreáticos, células foliculares da tireoide, epitélio de túbulos renais, hepatócitos e macrófagos de órgãos linfóides (Colodel et al. 2002a, Seitz et al. 2005a, Furlan et al. 2008, Furlan et al. 2009).

O alcalóide indolizidínico 1,2,8-triol, denominado swainsonina e identificado em *S. carpinifolia* (Colodel et al. 2002b), inibe as enzimas α -manosidase lisossomal e α -manosidase II do complexo de Golgi e, conseqüentemente, induz a doença de depósito lisossomal (DDL) (Agamanolis 1995, Moremen 2002) que afeta particularmente neurônios (Molyneux & James 1982, Stegelmeier et al. 1995). A detecção de oligossacarídeos na urina de caprinos intoxicados experimentalmente com *Sida carpinifolia* foi indicada como ferramenta diagnóstica para animais expostos ou intoxicados pela planta (Bedin et al. 2009). Doenças indistinguíveis têm sido associadas com consumo de *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp. nos Estados Unidos (Stegelmeier et al. 1995, Pfister et al. 2003), *Swainsona* spp. na Austrália (Colegate et al. 1979), *Ipomoea* spp. no Sudão (Damir et al. 1987), Moçambique (Balogh et al. 1999), Argentina (Armesto et al. 2004, Ríos et al. 2008) e Brasil (Barbosa et al. 2006, Armien et al. 2007, Antoniassi et al. 2007, Barbosa et al. 2007), além de *Turbina cordata*, também no Brasil (Dantas et al. 2006). Este trabalho relata a ocorrência da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul e descreve os achados epidemiológicos, clínico-patológicos, lectina-histoquímicos e ultraestruturais associados com a doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados quatro surtos (A, B, C e D) em que cinco bovinos foram intoxicados naturalmente por *Sida carpinifolia* no Rio Grande do Sul, no período 2001-2008. Os bovinos desse estudo foram numerados de 1 a 5 (Quadro 1). Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos pelos médicos veterinários das propriedades e pela equipe do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), durante visita às propriedades. Foram realizadas quatro necropsias e, em um

caso (Bovino 3), o material foi encaminhado ao SPV-UFRGS para exame histopatológico. Fragmentos de diversos órgãos foram coletados e fixados em formol 10 %, processados de forma rotineira para histologia e corados pela hematoxilina e eosina (HE). Fragmentos de tálamo do bovino 3 foram fixados em glutaraldeído e enviados para o Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) para exame de microscopia eletrônica de transmissão.

Fragmentos de SNC dos bovinos 2, 3 e 5 e do gânglio celíaco do bovino 3 foram submetidos à técnica de lectina-histoquímica (Goldstein & Hayes, 1978) com a utilização de lectinas obtidas comercialmente (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (Quadro 2). As lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. A inativação da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio 3 %, por 30 minutos e a recuperação, com calor e solução de tampão citrato 10 mM (pH 6.0), em banho-maria (100°C), por 15 minutos. Para a diminuição das ligações inespecíficas (background), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) 5 %, durante 30 minutos. Subsequentemente, as lectinas foram aplicadas na diluição de 5 µg/ml em PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4, exceto por Con-A que foi utilizada em 1 µg/ml. Seguindo-se, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 12-14 horas “*overnight*”, lavadas individualmente com água destilada e PBS, tratadas com estreptavidina (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 20 minutos em câmara úmida. A revelação dos cortes foi realizada com o cromógeno diaminobenzidine (DAB) (DAKO) durante 5 minutos ou até o corte ficar com uma coloração marrom e em seguida contracorados com hematoxilina de Harris. Por se tratar de doença com sinais clínicos nervosos, todos os casos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para raiva (Pedroso et al., 2008) e encefalopatia espongiforme transmissível (EET).

RESULTADOS

Epidemiologia e sinais clínicos

Nas propriedades visitadas, a pastagem nativa dos piquetes onde os bovinos eram mantidos constituía a principal fonte de alimento e apresentava infestações por *Sida carpinifolia*, às vezes, em matos de eucaliptos (*Eucalyptus globulus*) (Fig.1). Os surtos analisados A, B, C e D tiveram morbidade de 13%, 15%, 40% e 55,55%, respectivamente.

Surto A. Pequena propriedade localizada em Triunfo/RS, onde de um total de quinze bovinos, um morreu e outro desenvolveu doença caracterizada por emagrecimento, balanço e tremores da cabeça, além de quedas durante o andar. Esse bovino foi eutanasiado e necropsiado.

Surto B. Município de Triunfo, RS. De um total de vinte bovinos (quatro vacas, dois bois e quatorze bezerros), adoeceram três vacas em final de gestação. Após apresentar-se subitamente em decúbito esternal com fratura no membro posterior direito (provavelmente associada com tentativas infrutíferas de manter a estação), uma vaca foi eutanasiada e necropsiada.

Surto C. Município de Caxias do Sul, RS. Propriedade com 160 hectares e um total de trinta bovinos. História de doze mortes (oito vacas e quatro bezerros) nos últimos quatro meses, com quadro clínico de emagrecimento, dificuldade de permanecer em estação (Fig.2), incoordenação e quedas frequentes. Um bovino com esses sinais foi eutanasiado e fragmentos de fígado e cérebro do mesmo foram encaminhados ao SPV-UFRGS para análise histopatológica. Outro bovino, com doença semelhante e que foi eutanasiado e necropsiado, apresentou HR test (*head raising test*) positivo, o qual conforme Pienaar et al (1976), consiste em queda subsequente à flexão da cabeça para cima e caudalmente seguida, após alguns segundos, de soltura rápida.

Surto D. Município de Triunfo, RS. De um total de nove bovinos, cinco haviam morrido no decorrer de seis meses, com sinais clínicos de emagrecimento, incoordenação e quedas ao movimento. Um bovino em decúbito lateral, movimentos de pedalagem, tremores e hiperexcitação, além de HR test positivo foi eutanasiado e necropsiado. Dados referentes ao ano de ocorrência, raça, sexo e idade dos bovinos estão apresentados no Quadro 1.

Achados patológicos

Não foram observadas alterações macroscópicas significativas. As principais alterações histológicas foram observadas no sistema nervoso central e incluíram vacuolização dos neurônios de Purkinje do cerebelo (Fig.3), núcleos do tronco encefálico e alguns neurônios na camada granular, além de esferóides axonais. No cerebelo dos cinco bovinos havia neurônios encolhidos, com núcleos picnóticos, citoplasma eosinofílico (Fig.4) e, muitas vezes, desaparecimento de neurônios de Purkinje. Em dois casos havia tumefação e vacuolização leve a moderada de núcleos da ponte e, em três casos, havia tumefação e vacuolização leve a moderada no mesencéfalo, na altura dos colículos

rostrais. Na região do tálamo, havia leve tumefação de neurônios. Outras lesões consistiram de vacuolização das células acinares do pâncreas (2/3) (Fig.5), células foliculares da tireoide (1/3), células tubulares do rim (3/4) e hepatócitos (5/5). Em dois casos (Bovinos 1 e 3), verificou-se vacuolização leve a moderada de alguns neurônios do gânglio celíaco (2/2) e do plexo mioentérico (1/1), bem como do epitélio do epidídimo (1/1).

Microscopia eletrônica e lectina-histoquímica

No tálamo do bovino 3, havia vacúolos delimitados por membrana com conteúdo finamente granuloso (Fig.6). Na lectina-histoquímica, havia marcações no SNC, com graus variáveis de leves a moderadas, especificamente no citoplasma dos neurônios de Purkinje, da camada granular (inclusive os de Golgi) e da camada molecular do cerebelo. Tais marcações foram mais evidentes quando tratadas com *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA) (Fig.7) e *Succinyl Triticum vulgare* (sWGA). Também houve marcação em neurônios do gânglio celíaco do bovino 3 (Fig.8) e no telencéfalo. Não houve marcação para as outras lectinas.

Imuno-histoquímica

Todos os testes para raiva e EET foram negativos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da intoxicação por *Sida carpinifolia* nos bovinos foi baseado nos achados clínico-epidemiológicos, além das alterações histológicas, ultraestruturais e lectina-histoquímicas características. Durante visitas às propriedades com casos da doença, constatou-se que *S. carpinifolia* era a vegetação predominante nos piquetes e, portanto, a principal fonte de alimentação dos bovinos. Essa situação foi idêntica àquelas observadas em casos de intoxicação natural em caprinos, ovinos e pôneis no Rio Grande do Sul (Colodel et al. 2002a, Loretto et al. 2003, Seitz et al. 2005a), como também em bovinos em Santa Catarina (Furlan et al. 2009). Segundo os proprietários da região de Triunfo/RS, há vários anos tem havido mortes de bovinos afetados por doença caracterizada por sinais nervosos e mantidos em áreas infestadas por *S. carpinifolia* e com pouca disponibilidade de forragem. Há também relatos de que os animais adquiriam avidez pela planta, mesmo quando outros alimentos estavam à disposição.

Tais fatos também foram relatados previamente (Colodel et al. 2002a, Furlan et al. 2009).

Experimentalmente, demonstrou-se que doses de 10 g/kg por um período de 120 dias provocam alterações clínicas leves em bovinos; enquanto que 30 e 40 g/kg administradas por um período de 150 dias produzem alterações neurológicas moderadas a acentuadas (Furlan et al. 2008). O quadro clínico em bovinos (caracterizado principalmente por incoordenação motora, tremores musculares, decúbito, movimentos de pedalagem e morte) foi semelhante ao observado nas intoxicações naturais em caprinos (Driemeier et al. 2000, Colodel et al. 2002a), ovinos (Seitz et al. 2005a) e bovinos (Furlan et al. 2009), como também ao observado na reprodução experimental em caprinos, ovinos e bovinos (Colodel et al. 2002a, Seitz et al. 2005b, Furlan et al. 2008). Em dois dos bovinos avaliados, observou-se teste HR positivo, pois animais com alterações neurológicas, especialmente cerebelares e vestibulares, demonstram incoordenação motora e ataques epileptiformes, quando submetidos ao procedimento (Pienaar et al. 1976) que, portanto, tem sido ferramenta diagnóstica auxiliar em casos de intoxicação por *S. carpinifolia*.

As principais alterações microscópicas observadas nos bovinos intoxicados naturalmente desse estudo foi distensão e vacuolização dos neurônios de Purkinje do cerebelo, além de vacuolização nas células foliculares da tireoide e células acinares do pâncreas. Essas alterações foram observadas em bovinos intoxicados natural e experimentalmente (Furlan et al. 2008, Furlan et al. 2009), como também em caprinos, pôneis, ovinos e cervídeos intoxicados naturalmente (Driemeier et al. 2000, Colodel et al. 2002a, Loretto et al. 2003, Seitz et al. 2005a, Pedroso et al. 2009). *Solanum fastigiatum* (Jurubeba) (Mendez & Riet-Correa, 2008) e *Phalaris angusta* (Gava et al. 1999) devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de intoxicação por *S. carpinifolia* na Região Sul do Brasil, pois também causam quadro clínico neurológico. A intoxicação por *Solanum fastigiatum* apresenta sinais cerebelares caracterizados por crises periódicas do tipo epileptiforme, sendo que a duração varia de poucos segundos a um minuto. Nessa doença, há vacuolização celular limitada aos neurônios de Purkinje do cerebelo (Rech et al. 2006, Mendéz & Riet-Correa, 2008). A técnica de lectina-histoquímica permite a diferenciação, pois a intoxicação por *S. carpinifolia* se caracteriza como uma α -manosidase (Driemeier et al. 2000, Seitz et al. 2005a) e a intoxicação por *S. fastigiatum*, como uma doença de depósito glicolipídico (Paulovich et al. 2002). Na intoxicação por *Phalaris angusta*, evidencia-se macroscopicamente

uma coloração verde-azulada nas regiões do tálamo, mesencéfalo e medula oblonga e, na microscopia, há pigmento granular marrom-amarelado no pericário de neurônios que não é observado na intoxicação por *S. carpinifolia* (Souza & Irigoyen, 1999).

A histoquímica com lectinas tem se mostrado uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças de depósito lisossomal, incluindo as induzidas por plantas tóxicas. Na α -manosidose, há acúmulo de oligossacarídeos contendo resíduos α -manose e β -N-acetil-glicosamina (GlcNAc) (Beaudet, 1983). Todos os casos analisados demonstraram marcações para lectinas Con-A, sWGA e WGA. A lectina Con-A se liga mais especificamente à α -manose (Goldstein & Hayes, 1978) e as lectinas sWGA e WGA marcam os resíduos GlcNAc (Monsingny et al. 1980). Esses são os primeiros registros de intoxicação natural por *S. carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Por se encontrar disseminada no Rio Grande do Sul, ressalta-se a importância do diagnóstico de intoxicação por *Sida carpinifolia* em herbívoros no estado. Após o diagnóstico, os proprietários transferiram os demais bovinos dos locais infestados pela planta para outros locais livres de *S. carpinifolia* e não houve registros de novos casos da intoxicação.

Agradecimentos.- Os autores agradecem aos colegas e funcionários do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS pela valiosa ajuda. Parte deste trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Agamanolis D.P. 1995. The pathology of lysosomal storage diseases. *Pathol. Annu.* 30:247-285.
- Antoniassi N.A.B., Ferreira E.V., Santos C.E.P., Arruda L.P., Campos J.L.E., Nakazato L. & Colodel E.M. 2007. Intoxicação espontânea por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em bovinos no Pantanal Matogrossense. *Pesq. Vet. Bras.* 27:415-418.
- Armestro R.R., Repetto A.E., Ortega H.H., Peralta C.J., Pensiero J.F., Rei P.K. & Salverti N.R. 2004. Intoxicacion em cabras por ingestion de *Ipomoea hieronymi* var. *caichaquina* en la provincia de Catamarca, Argentina. *Vet. Arg.* 21:232-241.

- Armién A.G., Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Frese K. 2007. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae). *Vet. Pathol.* 44:170-184.
- Balogh K.I.M., Dimande A.P., Van der Lugt J.J., Molyneux R.J., Naudé T.W. & Welman W.G. 1999. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *J. Vet. Invest.* 11:266-273.
- Barbosa R.C., Riet-Correa F., Lima E.F., Medeiros R.M.T., Guedes K.M.R., Gardner D.R., Molyneux R.J. & Melo L.E.H. 2007. Experimental swainsonine poisoning in goats ingesting *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* (Convolvulaceae). *Pesq. Vet. Bras.* 27:409-414.
- Barbosa R.C., Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Lima E.F., Barros S.S., Gimeno E.J., Molyneux R.J. & Gardner D.R. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *Toxicon.* 47:371-379.
- Bedin M., Colodel E.M., Giugliani R., Zlotowski P., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2009. Urinary oligosaccharides: A peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning. *Toxicon.* 53:591-594.
- Beudet A.L. 1983. Disorders of glycoprotein degradation: mannosidosis, fucosidosis, sialidosis ad aspartylglycosaminuria, 788-802. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.A.S., Goldstein J.L. & Brown M.S. (Eds), *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. 5th ed. McGraw-Hill: New York.
- Colegate S.M., Dorling P.R. & Huxtable CR. 1979. A spectroscopic investigation of swainsonine: an alfa-mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. *Aust. J. Chem.* 32:2257-2264.
- Colodel E.M., Driemeier D., Loretto A.P., Gimeno E.J., Traverso S.D., Seitz A.L. & Zlotowski P. 2002a. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 22:51-57.
- Colodel E.M., Gardner D.R., Zlotowski P. & Driemeier D. 2002b. Identification of Swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* 44:177-178.
- Damir H.A., Adam S. & Tartour G. 1987. The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. *Vet. Hum. Toxicol.* 29:316-319.

- Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Gardner D.R., Medeiros R.M.T., Barros S.S., Anjos B.L. & Lucena R.B. 2007. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. *Toxicon*. 49:111-116.
- Driemeier D., Colodel E.M., Gimeno E.J. & Barros S.S. 2000. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in goats. *Vet. Pathol.* 37:153-159.
- Furlan F.H., Lucioli J., Veronezi L.O., Traverso S.D. & Gava A. 2008. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28:57-62.
- Furlan F.H., Lucioli J., Veronezi L.O., Medeiros A., Barros S.S., Traverso S.D. & Gava A. 2009. Spontaneous lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in cattle. *Vet. Pathol.* 46:343-347.
- Gava A., Sousa R.S., de Deus M.S., Pilati C., Cristani J., Mori A.M. & Neves D.S. 1999. *Phalaris angusta* (Gramineae) como causa de enfermidade neurológica em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 19:35-38.
- Godoy G.S., Castro Netto A., Momo C., Dune A.C., Ávila L.G., Alessi A.C., Marques L.C. & Castro M.B. 2005. Intoxicação natural por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57(Supl.1):25.
- Goldstein I.J. & Hayes C.E. 1978. The lectins carbohydrate binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:127-340.
- Kissmann K.G. & Groth D.G. 2000. Plantas Infestantes e Nocivas. Tomo III, BASF S.A., São Bernardo do Campo, SP. 722p.
- Lorenzi H. 2000. Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 5^a ed. Plantarum Ltda, Nova Odessa, SP. 339p.
- Loretti A.L.P., Colodel E.M., Gimeno E.J. & Driemeier. 2003. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. *Equine Vet. J.* 35:434-438.
- Méndez M. del C. & Riet-Correa F. 2008. Plantas Tóxicas e Micotoxicoses. Editora e Gráfica Universitária, Pelotas, RS. 298p.
- Molyneux R.J. & James L.F. 1982. Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science*. 216:190-191.

- Monsigny M., Roche A.C., Sene C., Marget-Domma R. & Delmotte F. 1980. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates?. *Eur. J. Biochem.* 104:147.
- Moremen K.W. 2002. Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Bioch. Biophys. Acta.* 1573:225-235.
- Paganini Filho W.S., Tirapelli A.C.N., Pereira T.G., Wouters A.T.B. & Wouters F. 2008. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em ovinos. Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, 28 jun. a 03 jul., Campo Grande, MS. (Resumo).
- Paulovich F.B., Portiansky E.L., Gimeno E.J., Schild A.L., Méndez M. del C. & Riet-Correa F. 2002. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. *J. Vet. Med. A.* 49:473-477.
- Pedroso P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Júnior P.S. & Driemeier D. 2008. Padronização da técnica de imunohistoquímica para raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos fixados em formol e emblocados em parafina. *Pesq. Vet. Bras.* 28:627-632.
- Pedroso P.M.O., Von Hohendorf R, Oliveira L.G.S., Schmitz M., Cruz C.E.F., Driemeier D. 2009. *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in fallow deer (*Dama dama*). *J. Zoo Wildl. Med.* 40:583-585.
- Pfister J.A., Stegelmeier B.L., Gardner D.R. & James L.F. 2003. Grazing of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) by cattle and horses in Arizona. *J. Anim. Sci.* 81:2285-2293.
- Pienaar F.M., Kellerman T.S., Basson P.A., Jenkins W.L. & Vahrmeijer J. 1976. Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N.E. Br. Onderstepoort J. Vet. Res. 43:67-74.
- Rech R.R., Rissi D.R., Rodrigues A., Pierezan F., Piazer J.V.M., Kommers G.D. & Barros C.S.L. 2006. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. *Pesq. Vet. Bras.* 26:183-189.
- Ríos E., Cholich L., Silva J., Acosta de Pérez O. 2008. Histopathological lesions in central nervous system of goats poisoned by *Ipomoea carnea*. *Rev. Vet.* 19:130-134.

- Seitz A.L., Colodel E.M., Schmitz M., Gimeno E.J. & Driemeier D. 2005a. Use de lectin histochemistry to diagnose *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in sheep. Vet. Rec. 156:386-388.
- Seitz A.L., Colodel E.M., Barros S.S. & Driemeier D. 2005b. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos. Pesq. Vet. Bras. 25:15-20.
- Sousa R.S. & Irigoyen L.F. 1999. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 19:116-122.
- Stegelmeier B.L., Molyneux R.J., Elbein A.D. & James L.F. 1995. The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. Vet. Pathol. 32: 289-298.

Legendas das figuras

- Fig.1. Infestação por *Sida carpinifolia* em mato de Eucaliptos (*Eucalyptus globulus*), Rio Grande do Sul. No detalhe, o aspecto de *Sida carpinifolia*.
- Fig.2. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 3 com dificuldade de permanecer em estação após o “HR test”.
- Fig.3. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 2. Vacuolização de neurônios de Purkinje do cerebelo. HE, obj. 40x.
- Fig.4. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 2. Cerebelo. Neurônio vacuolizado (seta) e dois neurônios retraídos e eosinofílicos (cabeça de seta). HE, obj. 20x.
- Fig.5. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 5. Vacuolização moderada das células acinares do pâncreas. HE, obj. 40x.
- Fig.6. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 3. Tálamo. Vacúolos contendo material finamente granulado delimitado por membrana. Microscopia eletrônica de transmissão. Barra: 2 μm .
- Fig.7. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 2. Marcação para *Triticum vulgare* (WGA) em neurônio de Purkinje. Lectina-histoquímica, obj. 40x.
- Fig.8. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. Bovino 3. Marcação para *Concanavalia ensiformis* (Con-A) em neurônio do gânglio celíaco. Lectina-histoquímica, obj. 40x.

Quadro 1. Dados gerais referentes aos bovinos intoxicados naturalmente por *Sida carpinifolia* no Rio Grande do Sul

Bovino nº	Surto	Ano	Raça	Sexo	Idade (anos)
1	A	2001	SRD	F	0,8
2	B	2006	Holandês	F	5
3	C	2008	Holandês	F	12
4	C	2008	Holandês	F	0,8
5	D	2008	SRD	M	1,5

SRD: sem raça definida, F: fêmea; M, macho.

Quadro 2. Lectinas utilizadas no estudo histoquímico de intoxicação natural por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul

Lectina	Abreviatura	Especificidade Carbohidrato ^a
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con-A	α -D-Man; α -D-Glc
<i>Glycine Max</i>	SBA	α -D-GalNac; β -D-GalNac; α e β -Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNac
<i>Ulex europaeus-1</i>	UEA-1	α -L-Fuc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNac, NeuNac
<i>Succinyl-WGA</i>	sWGA	(β -(1-4)-D-GlcNac) ²
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D-Gal(1-3) GalNac
<i>Ricinus communis-1</i>	RCA-1	β -D-Gal > α -D-Gal

^aGoldstein & Hayes (1978). Fuc: fucose; Gal: galactose; GalNac: N-acetil-galactosamina; Glc: glicose; GlcNac: N-acetil-glicosamina; Man: manose; NeuNac: ácido N-acetil-neuraminico.



Figura 1



Figura 2

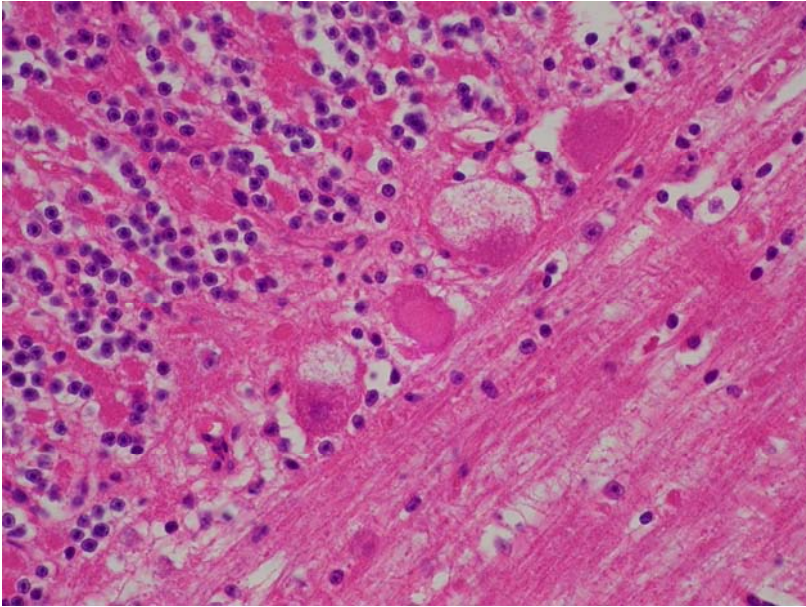


Figura 3

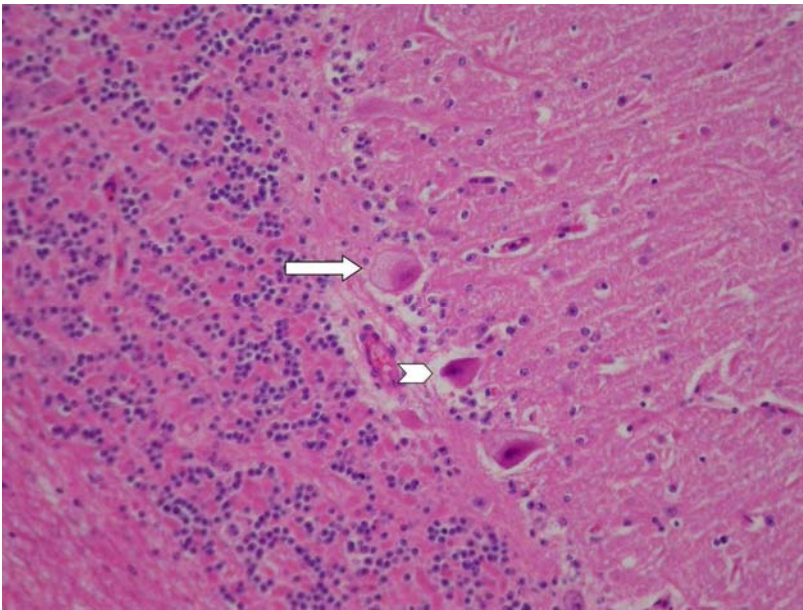


Figura 4

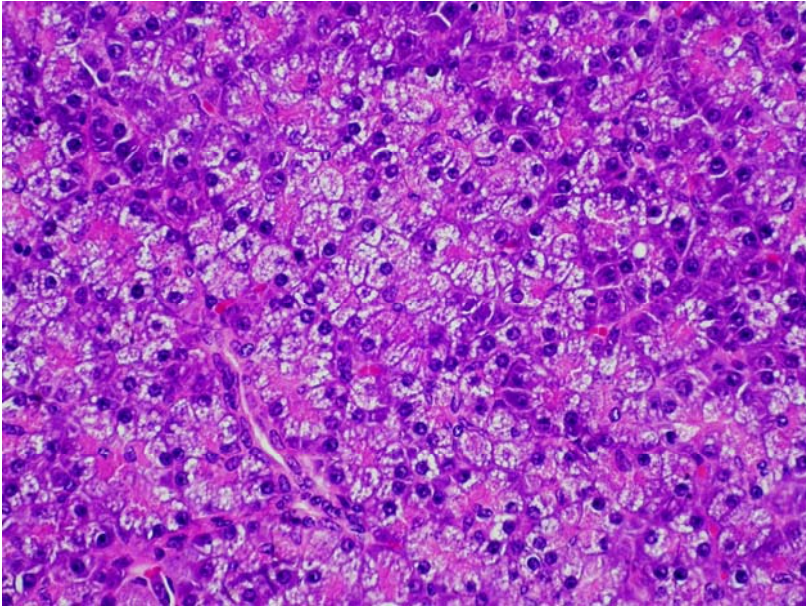


Figura 5

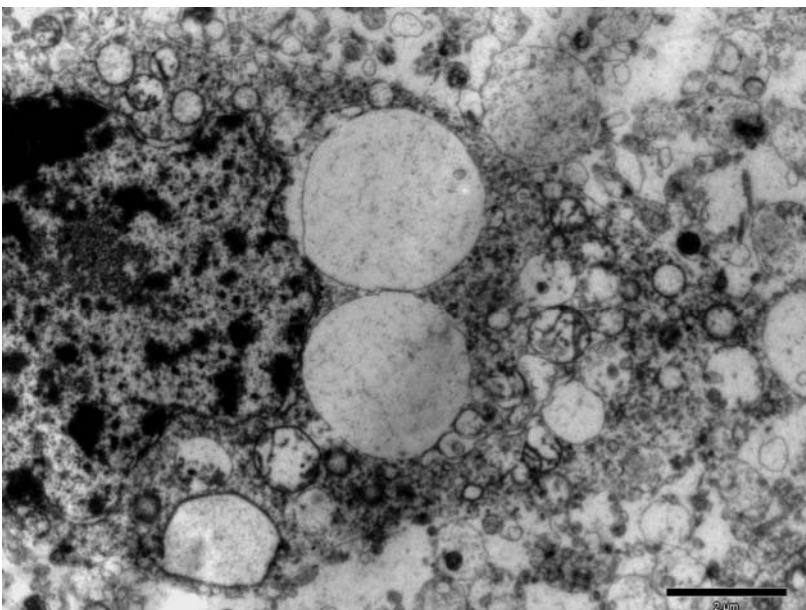


Figura 6

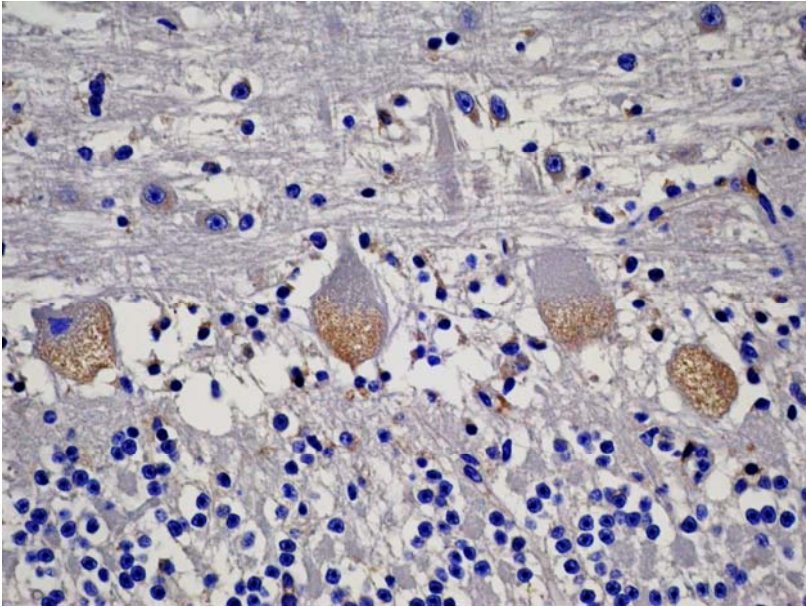


Figura 7

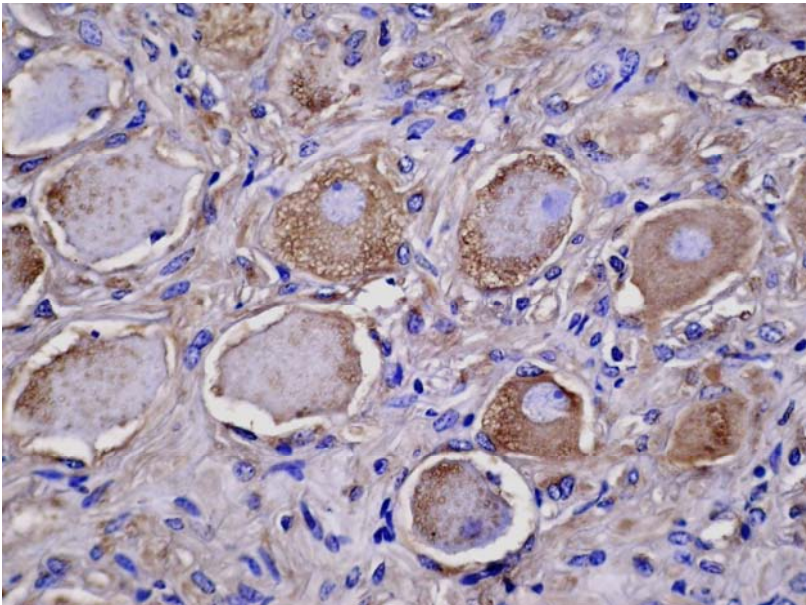


Figura 8

3.3 ARTIGO 3

**Pathological findings in fetuses of goats and cattle poisoned by *Sida*
*carpinifolia***

**Pedro Miguel Ocampos Pedroso, Edson Moleta Colodel, Anderson Luiz Seitz
& David Driemeier**

**ARTIGO SERÁ SUBMETIDO PARA
PUBLICAÇÃO EM EXPERIMENTAL AND
TOXICOLOGIC PATHOLOGY**

Pathological findings in fetuses of goats and cattle poisoned by *Sida carpinifolia*

Pedro M. O. Pedroso^a, Edson Moleta Colodel^b, Anderson Luiz Seitz^b, David Driemeier^a

^aDepartamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^bDepartamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Brazil.

Abstract

In Brazil, the consumption by livestock of *Sida carpinifolia* has been associated with neurological diseases linked to lysosomal storage disorders. This report describes the pathological findings observed in two caprine fetuses from dams that were experimentally poisoned with *Sida carpinifolia*. The goats were orally dosed with 10 and 13g/kg of a paste of green chopped *Sida carpinifolia* for 30 days and were observed for an additional 15 days period after last dosage with the plant, thereafter they were euthanized and necropsied. Goats showed just mild clinical signs. The study also includes the findings in one bovine fetus from a naturally *S. carpinifolia* poisoned cow, which showed mild incoordination, generalized tremors, staggering, and frequent falls. While there were no significant histopathological changes in the goats, vacuolation of Purkinje neurons of cerebellum, pancreatic acinar cells, and thyroid follicular cells were observed in the cow. The main microscopic changes observed in fetal goats and cattle were vacuolation in the epithelium of renal tubules, thyroid follicular cells, and Purkinje neurons of the cerebellum. Electron microscopy on sections of the bovine fetus revealed vacuoles containing finely granular material enclosed in membrane and lectin-histochemistry of CNS sections from goat fetuses marked lightly to sWGA lectins, WGA, and Con-A.

Keywords: swainsonine; *Sida carpinifolia*; lysosomal storage disease; pathological findings; lectin-histochemistry; caprine and bovine fetuses.

Introduction

In Brazil, the consumption by livestock of *Sida carpinifolia*, also named *Sida acuta* var. *carpinifolia* (L.f) K. Schum, has been associated with phenotypes resembling lysosomal storage disorders (Driemeier et al., 2000). Although native to tropical America, *S. carpinifolia* has spread throughout the tropics and subtropics, where it is particularly abundant in humid and reduced sunlight areas (Kismann and Groth, 2000; Lorenzi, 2000). The disease is caused by the indolizidine alkaloid swainsonina (Colodel et al., 2002a) that inhibits the lysosomal enzyme α -mannosidase and induces the storage of mannose-containing oligosaccharides in lysosomes of several cells, particularly neurons, hepatocytes, and acinar pancreatic cells (Stegelmeier et al., 1995; Jolly and walker, 1997). In the first description of the disease in goats (Driemeier et al., 2000), high rates of abortions and stillbirths were reported. The clinical and pathological features seen in herbivores poisoned by *S. carpinifolia* are indistinguishable from those described in livestock intoxicated by plants in the genera *Swainsona* spp. in Australia (Colegate et al., 1979), *Astragalus* spp. and *Oxytropis* spp. in United States (Stegelmeier et al., 1995; Pfister et al., 2003), *Ipomoea* spp. in Brazil (Barbosa et al., 2006; Armien et al., 2007; Barbosa et al., 2007; Antoniassi et al., 2007), and *Turbina cordata* (Dantas et al., 2007) in Brazil. This communication describes the pathologic findings, observed in fetuses from livestock intoxicated by *Sida carpinifolia*.

Materials and methods

Experimental animals

Two Saanen goats (1 and 2) with 2 years of age, at approximately six months of pregnancy were dosed with 10 and 13g/kg of green *Sida carpinifolia* for 30 days. Animals were observed for an additional period of 15 days after the consumption of the plant. The goats originated from farms free from *Sida carpinifolia* infestation. The plant was chopped and moistened to form a paste, which was orally administered to goats using an adapted 60 ml syringe. The goats were kept in individual pens, where they also received water *ad libitum* and 200g of commercial concentrate and alfalfa hay. A six-month pregnant control goat received alfalfa hay, 200g of commercial concentrate and water *ad libitum*. After 15 days of the last dosage, the goats were euthanized and necropsied (Colodel et al., 2002b). The experiment was approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and the animal protocol was approved by the Research and Postgraduate Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (Bedin et al., 2010).

Necropsy and histopathology

The study also included a five months bovine fetus, whose dam had been spontaneously poisoned after consumption of *S. carpinifolia*. The cow and those two goats were necropsied and fragments of numerous organs were collected and fixed in 10% formalin, processed routinely for histology and stained with hematoxylin and eosin. The same procedures were conducted in the caprine (1 and 2) and the bovine (3) fetuses.

Lectin-histochemical technique

Fragments of central nervous system (CNS) from the three fetuses were prepared and studied under lectin-histochemistry. Lectins used are shown in Table 1. The slides were deparaffinized in xylene and hydrated in decreasing concentrations of alcohol. The inactivation of endogenous peroxidase was performed with 3% hydrogen peroxide for 30 minutes and with heat recovery using a solution of 10 mM citrate buffer (pH 6.0) in a water bath (100⁰C) for 15 minutes. For the reduction of specific binding (background), sections were treated with skim milk (Molico®) 5% for 30 minutes. Subsequently, the lectins were applied at a dilution of 5 µg/ml in PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4, except for the lectin Con-A, which was diluted at 1 µg/ml. Then the slides were incubated in a moist chamber at 40⁰C for 12-14 hours “overnight”. Thereafter, each slide with their respective lectins was individually washed with distilled water and PBS. Streptavidin was then applied (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) for 20 minutes in a moist chamber. The revelation of the sections was performed with the chromogen diaminobenzidine (DAB) (DAKO) for 10 minutes and then counterstained with Harris hematoxylin for 30 seconds and mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Staint Louis, USA) and observed under optical microscope.

Electron microscopy

Fragments (measuring approximately 3mm) from CNS from the cow and its fetus were fixed in 2% glutaraldehyde in phosphate buffer. Later, they were post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Epon. The ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a transmission electron microscope.

Results

During the experimental period, goats showed only mild clinical signs such as slow moving and dullness, but no change in feces consistency was noticed. After the end of daily dosages, goats started to increase body weight, at a rate of 119-110 g/day. The sole significant gross findings seen in the goats were edema and increased size of lymph nodes, but there were no significant histopathological changes. The cow presented a clinical picture of incoordination, generalized tremors, staggering and frequent falls when it was stimulated to move. While the cow had no gross changes at necropsy, histopathological changes included vacuolation of Purkinje cells of cerebellum, pancreatic acinar cells, and thyroid follicular cells. Transmission electron microscopy of sections from thalamus of the cow revealed vacuoles containing finely granular material surrounded by membrane. The main histopathological changes observed in the caprine fetuses were moderate distention and vacuolization of the epithelium of renal tubules and mild disappearance of Nissl substance in neurons of the CNS. There were no pathological changes in the both, the control goat its fetuses. The main histological findings observed in the bovine fetus were marked vacuolation of epithelial cells of renal tubules and moderate vacuolation of the follicular cells of the thyroid (Figure 1). The cerebellum of the bovine fetus had mild vacuolization of the Purkinje cells, which under transmission electron microscopy revealed small vacuoles containing finely granular material membrane-delimited. Lectin-histochemistry of CNS sections from goat fetuses showed mild staining with the sWGA (Figure 2), WGA and Con-A.

Discussion and conclusion

Poisoning by *Sida carpinifolia* in these animals was consistent with clinical, histopathological, ultrastructural, and lectin-histochemical findings from previous reports. It has been demonstrated that livestock poisoned by plants containing swainsonine such as *Oxytropis* spp. and *Astragalus* spp. (locoweeds) have also been affected by congenital defects, birth of weak offspring, and abortions (James, 1972; Hartley and James, 1975), which have been associated with transplacental toxicosis (James, 1971) interfering with embryonic and fetal development (James et al., 1992). The consumption by pregnant goats of *Sida carpinifolia* has been associated with abortions and stillbirths; however, after stopping consumption of *S. carpinifolia*, goats conceive and due normal kids (Driemeier et al., 2000; Colodel et al., 2002a). The aforementioned factors suggest that *S. carpinifolia* consumption may affect fertility in open goats, as well as may cause pregnancy losses. In addition, sheep experimentally poisoned with *S. carpinifolia* experienced complete clinical recovery after ceasing consumption for a few days (Seitz et al., 2005). Similar findings were observed here. A lamb born from an ewe that was experimentally dosed with *Astragalus lentiginosus* during 120 days of gestation presented vacuolization of the epithelial cells of renal tubules, thyroid follicular cells, and hepatocyte injury, but no neuronal alterations were observed (James, 1971). The caprine and bovine fetuses from this study had not their gestation interrupted; however, if animals had consumed the plant for longer periods, it may be said that abortion or other disorder could have affected them. These fetuses exhibited histopathological lesions mainly located in epithelial cells of proximal convoluted renal tubules and follicular cells of thyroid; therefore, similar findings as observed in sheep experimentally poisoned by *Astragalus lentiginosus* (James, 1971;

James, 1972; Hartley and James, 1975). If such lesions would be capable of producing abortion, stillbirth, or other reproductive disorder in these fetuses is unknown and remain to be proved. Intoxication by *S. carpinifolia* has been characterized as an α -mannosidase (Driemeier et al., 2000), in which accumulation of oligosaccharides containing α -mannose and β -N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) has been demonstrated (Beaudet, 1983). Sections from fetuses of this showed affinity by the lectins sWGA, WGA, and Con-A. Lectins WGA and sWGA characteristically mark GlcNAc residues (Monsingny et al., 1980), and lectin Con-A binds specifically to α -mannose (Goldstein and Hayes, 1978). Pattern seen on lectin-histochemistry here is similar to that observed previously in *S. carpinifolia* poisoned sheep and deer (Seitz et al., 2005; Pedroso et al., 2009). Findings reported here confirm that *Sida carpinifolia* must be included in the list of poisonous plants linked to reproduction disorders in Brazilian livestock such as *Aspidosperma pyriformium*, *Ateleia glazioviana*, *Tetrapteryx* spp., *Stryphnodendron* spp., and *Mimosa tenuiflora* (Riet-Correa, 2007; Lima and Soto-Blanco, 2010).

Acknowledgements

This study was funded by The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. Authors are grateful to professor Cláudio Estêvão Farias da Cruz for reviewing this manuscript.

Bibliography

Antoniassi NAB, Ferreira EV, Santos CEP, Arruda LP, Campos JLE, Nakazato L, Colodel, EM. Intoxicação espontânea por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*

- (Convolvulaceae) em bovinos no Pantanal Matogrossense. *Pesq Vet Bras* 2007;27:415-18.
- Armién AG, Tokarnia CH, Peixoto PV, Frese K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). *Vet Pathol* 2007;44:170-84.
- Barbosa RC, Riet-Correa F, Lima EF, Medeiros RMT, Guedes KMR, Gardner DR, Molyneux RJ, Melo LEH. Experimental swainsonine poisoning in goats ingesting *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* (Convolvulaceae). *Pesq Vet Bras* 2007;27:409-14.
- Barbosa RC, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Lima EF, Barros SS, Gimeno EJ, Molyneux RJ, Gardner DR. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *Toxicon* 2006;47:371-79.
- Bedin M, Colodel EM, Viapiana M, Matte U, Driemeier D, Giugliani R. Alpha-mannosidase activity in goats fed *Sida carpinifolia*. *Exp Toxicol Pathol* 2010;62:191-5.
- Beaudet AL. Disorders of glycoprotein degradation: mannosidosis, fucosidosis, sialosidosis ad aspartylglycosaminuria. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DAS, Goldstein JL, Brown MS, editors. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, New York: McGraw-Hill;1983.p. 788-802.
- Colegate SM, Dorling PR, Huxtable CR. A spectroscopic investigation of swainsonina: an alfa-mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. *Aust J Chemical* 1979;32:2257-264.

- Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D. Identification of Swainsonina as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol* 2002a;44:177-78.
- Colodel EM, Driemeier D, Loretto AP, Gimeno EJ, Traverso SD, Seitz AL, Zlotowski P. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 2002b;22:51-7.
- Dantas AFM, Riet-Correa F, Gardner DR, Medeiros RMT, Barros SS, Anjos BL, Lucena RB. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. *Toxicon* 2007;49:111-16.
- Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ, Barros SS. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in goats. *Vet Pathol* 2000;37:153-59.
- Goldstein IJ, Hayes CE. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem. Biochem* 1978;35:127-340.
- Hartley WJ, James LF. Fetal and maternal lesions in pregnant ewes ingesting Locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Am J Vet Res* 1975;36:825-6.
- James LF. Lesions in neonatal lambs resulting from maternal ingestion of Locoweed. *Cornell Vet* 1971;61:667-70.
- James LF. Effect of Locoweed on fetal development: preliminary study in sheep. *Am J Vet Res* 1972; 33:835-40.
- James LF, Panter KE, Nielsen DB, Molyneux RJ. The effect of natural toxins on reproduction in livestock. *J Anim Sci* 1992;70:1573-9.
- Jolly, R.D., Walkley, S.U., 1997. Lysosomal storage disease of animals: an essay in comparative pathology. *Vet Pathol* 34, 527–548.

- Kissmann KG, Groth DG. 2000. Plantas Infestantes e Nocivas. São Paulo: BASF S.A;2000. p. 137-172.
- Lima MCJ, Soto-Blanco B. Poisoning in goats by *Aspidosderma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. *Toxicon* 2010;55:2-3:320-4.
- Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa: Plantarum Ltda;2000.
- Monsigny M, Roche AC, Sene C, Marget-Domma R, Delmotte F. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates?. *Eur J Biochem* 1980;104:147
- Pedroso PMO, Von Hohendorf R, Oliveira LGS, Schmitz M, Cruz CEF, Driemeier D. *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in fallow deer (*Dama dama*). *J Zoo Wildl Med* 2009;40:583-5.
- Pfister JA, Stegelmeier BL, Gardner DR, James LF. Grazing of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) by cattle and horses in Arizona. *J Anim Sci* 2003;81: 2285-93.
- Riet-Correa F. Plantas tóxicas e micotoxinas que afetam a reprodução em ruminantes e equinos no Brasil. *Biológico* 2007;69:63-8.
- Seitz AL, Colodel EM, Schmitz M, Gimeno EJ, Driemeier D. Use de lectin histochemistry to diagnose *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in sheep. *Vet Rec* 2005;156:386-8.
- Stegelmeier BL, Molyneux RJ, Elbein AD, James LF. The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. *Vet Pathol* 1995;32:289-98.

Table 1. Lectins used in histochemical study of poisoning by *Sida carpinifolia*.

Lectin	Abbreviation	Carbohydrate specificity ^a
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con-A	α -D-Man; α -D-Glc
<i>Glycine max</i>	SBA	α -D-GalNac; β -D-GalNac; α e β -Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNac
<i>Ulex europaeus-1</i>	UEA-1	α -L-Fuc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNac, NeuNac
<i>Succinyl-WGA</i>	sWGA	(β -(1-4)-D-GlcNac) ²
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D-Gal(1-3) GalNac
<i>Ricinus communis-1</i>	RCA-1	β -D-Gal > α -D-Gal

^aGoldstein IJ, Hayes CE (1978). Fuc: fucose; Gal: galactose; GalNac: N-acetil-galactosamina; Glc: glicose; GlcNac: N-acetil-glicosamina; Man: manose; NeuNac: acid N-acetil-neuraminico.

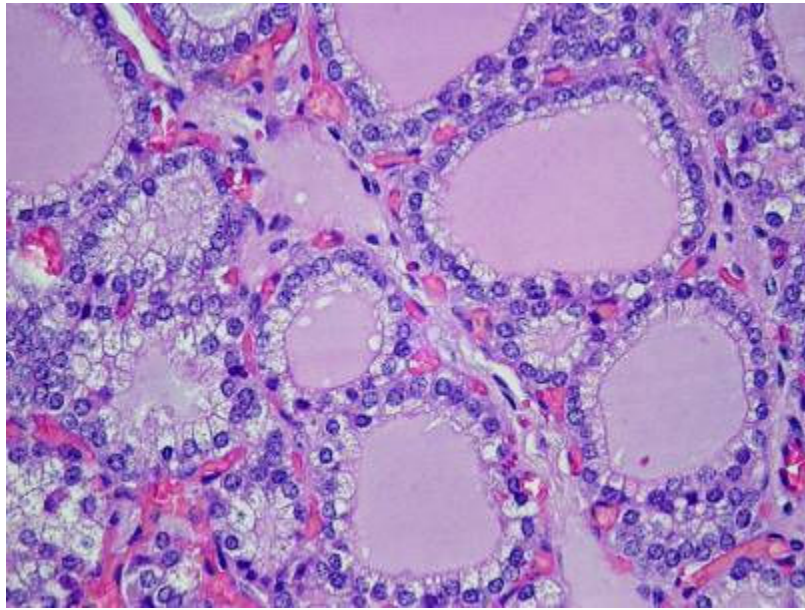


Figure 1 - Bovine fetus. Thyroid. Moderate vacuolation of follicular cells. Hematoxylin and Eosin, Obj. 40x.

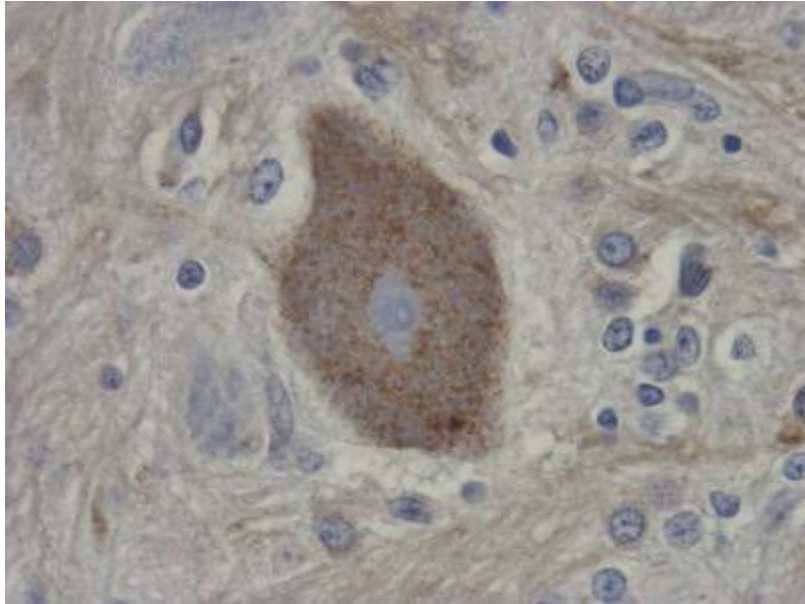


Figure 2 - Caprine fetus 1. CNS. Marking for *Succinyl* WGA (sWGA). Lectin-histochemical. Obj. 40x.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico de intoxicação natural por *Sida carpinifolia* nos bovinos e no cervídeo deste estudo foi baseado principalmente pelos dados epidemiológicos, quadro clínico, achados patológicos característicos, ultra-estrutural e pela lectina-histoquímica.

Em visita as propriedades acometidas se pode observar que *S. carpinifolia* era a vegetação predominante nos piquetes, sendo a principal fonte de alimentação dos animais, contribuindo significativamente para o quadro de intoxicação. Essa situação foi a mesma observada em casos de intoxicação natural em caprinos, ovinos e pôneis no Rio Grande do Sul (COLODEL *et al.*, 2002a; LORETTI *et al.*, 2003a; SEITZ *et al.*, 2005a), como também em bovinos no Estado de Santa Catarina (FURLAN *et al.* 2009). Conforme entrevistas com os proprietários da região há anos vem morrendo bovinos com sintomatologia nervosa no qual estavam em piquetes com pouca disponibilidade de pastagem e muitas vezes *S. carpinifolia* era a vegetação predominante, sendo que um tempo após a introdução na área infestada, os animais adquiriam avidez pela planta, mesmo tendo outros alimentos à disposição, como também relatado por outros autores (COLODEL *et al.*, 2002a; FURLAN *et al.*, 2009).

Experimentalmente foi demonstrado em bovinos que doses a partir de 10 g/kg por um período de 120 dias provocaram alterações clínicas leves, enquanto que nas doses de 30 e 40 g/kg por um período de 150 dias produziu alterações neurológica moderada a acentuada (FURLAN *et al.*, 2008). Os sinais clínicos observados nos bovinos deste estudo foram semelhantes aos observados na intoxicação natural em caprinos (DRIEMEIER *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002a), ovinos (SEITZ *et al.*, 2005a) e bovinos (FURLAN *et al.*, 2009), como também na reprodução experimental em caprinos, ovinos e bovinos (COLODEL *et al.*, 2002a; SEITZ *et al.*, 2005b; FURLAN *et al.*, 2008).

A principal alteração histopatológica observada nos bovinos foi distensão e vacuolização dos neurônios de Purkinje do cerebelo, como também vacuolização nas células foliculares da tireoide e células acinares do pâncreas. Essas alterações também foram observadas em bovinos intoxicados naturalmente e experimentalmente em Santa Catarina (FURLAN *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009), como também em caprinos, pôneis, ovinos naturalmente (DRIEMEIER *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002a; LORETTI *et al.*, 2003a; SEITZ *et al.*, 2005a).

Logo após as mortes dos bovinos notificados neste trabalho, os proprietários retiraram o restante dos animais que permaneciam em campos infestados e transferiram-os para outros locais onde não havia a presença da planta, cessando assim com o quadro clínico e com as mortes. Na intoxicação por *S. carpinifolia* no cervídeo, embora apenas um animal foi afetado, comparativamente com os outros casos de intoxicação em outras espécies diagnosticadas neste Laboratório, as vacuolizações nos neurônios de Purkinje do cerebelo deste caso foram de maior gravidade. Fatores que afetam o consumo de plantas tóxicas por herbívoros podem incluir falta de forragem adequada, desnutrição, palatabilidade, predominância na área e pelas propriedades viciantes da planta.

Na Região Sul do Brasil, duas plantas de interesse pecuário devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de *S. carpinifolia*, por causarem quadro clínico neurológico, são *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) (Jurubeba) (MENDEZ & RIET-CORREA, 2008) e *Phalaris angusta* (GAVA *et al.*, 1999). *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* apresenta sinais cerebelares caracterizados por crises periódicas do tipo epileptiforme, sendo que a duração varia de poucos segundos a um minuto. Cursa com fina vacuolização celular limitada aos neurônios de Purkinje do cerebelo (RECH *et al.*, 2006; MENDÉZ & RIET-CORREA, 2008). No entanto, com a técnica de lectina-histoquímica elas podem ser diferenciadas, pois na intoxicação por *S. carpinifolia* é caracterizada como uma α -manosidase (DRIEMEIER *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 2005a) e na intoxicação por *S. fastigiatum* como uma doença de depósito glicolipídico (PAULOVICH *et al.*, 2002). Na intoxicação por *Phalaris angusta* observa-se uma coloração verde-azulada nas regiões do tálamo, mesencéfalo e medula oblonga e na microscopia há pigmento granular marrom-amarelado no pericário de neurônios (SOUZA & IRIGOYEN, 1999). Quando a intoxicação natural por *Sida carpinifolia* foi diagnosticada pela primeira vez em caprinos no ano de 1997 que pastavam em uma área infestada por *S. carpinifolia*, umas das queixas do proprietário é que nesse rebanho havia animais com sinais neurológicos e problemas reprodutivos como uma alta taxa de abortos e natimortos (DRIEMEIER *et al.*, 2000). Tem sido demonstrado nas intoxicações naturais e experimentais que animais que consomem certas plantas dos gêneros *Stragalus* e *Oxytropis* (Locoweeds) têm causado problemas reprodutivos em animais como malformações congênitas, abortos e nascimento de animais fracos (JAMES, 1972; HARTLEY & JAMES, 1975). A forma transplacentária tem sido mencionada como forma de toxicose pela ingestão de plantas tóxicas (JAMES, 1971).

Estas toxinas atravessam as membranas placentárias e interferem com o desenvolvimento embrionário e fetal (JAMES *et al.*, 1992).

Em ovinos intoxicados experimentalmente foi observado que alguns dias após cessar o consumo da planta pode haver recuperação clínica dos animais testados e com ausência de lesões em animais levemente afetados (SEITZ *et al.*, 2005b), sendo este dado semelhante ao observado nas cabras deste estudo. Em experimento realizado por James (1971), um cordeiro nascido de uma ovelha que havia sido administrado *Astragalus lentiginosus* durante o período de 100-120 dias de gestação, teve vacuolização do citoplasma do rim, células foliculares da tireoide e de hepatócitos e lesões neuronais não foram observadas. Os fetos caprinos e bovino deste estudo apresentaram lesões histopatológicas principalmente nas células epiteliais do rim e nas células foliculares da tireoide, sendo semelhantes as observadas na intoxicação experimental por *Astragalus lentiginosus* em ovelhas (JAMES, 1971; JAMES, 1972; HARTLEY & JAMES, 1975).

A intoxicação por *S. carpinifolia* é caracterizada como uma α -manosidase (DRIEMEIER *et al.*, 2000). Os animais e os fetos deste estudo obtiveram afinidade para as lectinas Swga, WGA e para Con-A. Na α -manosidose há acúmulo de oligossacarídeos contendo resíduos α -manose e resíduos β -N-acetil-glicosamina (GlcNAc) (BEAUDET, 1983). As lectinas sWGA e WGA marcam os resíduos GlcNAc (MONSINGNY *et al.* 1980) e a lectina Con-A liga-se mais especificamente a α -manose (GOLDSTEIN & HAYES, 1978).

5. CONCLUSÃO

1. As lesões histopatológicas no sistema nervoso central do cervídeo foram mais acentuadas em relação as outras espécies estudadas.
2. A intoxicação natural por *Sida carpinifolia* é uma importante doença neurológica em bovinos na abrangência do SPV-UFRGS.
3. As menores dosagens utilizadas na intoxicação experimental por *S. carpinifolia* em caprinos causou alterações patológicas em fetos.
4. A técnica de lectina-histoquímica mostrou-se importante como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de doenças de depósito lisossomal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAMANOLIS, D.P. The pathology of lysosomal storage diseases. **Pathology annual**. v. 30, p. 247-285, 1995.
- ANJOS, B.L. Doutorado em Patologia Veterinária. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- ANTONIASSI, N.A.B.; FERREIRA, E.V.; SANTOS, C.E.P.; ARRUDA, L.P.; CAMPOS, J.L.E.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E.M. Intoxicação espontânea por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em bovinos no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, p. 415-418, 2007.
- ARMESTRO, R.R.; REPETTO, A.E.; ORTEGA, H.H.; PERALTA, C.J.; PENSIERO, J.F.; REI, P.K.; SALVERTI, N.R. Intoxicacion em cabras por ingestion de *Ipomoea hieronymi* var. *caichaquina* en la provincia de Catamarca, Argentina. **Veterinaria Argentina**. v. 21, p. 232-241, 2004.
- ARMIÉN, A.G.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; FRESE, K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). **Veterinary Pathology**. v. 44, p. 170-184, 2007.
- BALOGH, K.I.M.; DIMANDE, A.P.; VAN Der LUGT, J.J.; MOLYNEUX, R.J.; NAUDÉ, T.W.; WELMAN, W.G. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, p.266-273, 1999.
- BARBOSA, R.C.; RIET-CORREA, F.; LIMA, E.F.; MEDEIROS, R.M.T.; GUEDES, K.M.R.; GARDNER, D.R.; MOLYNEUX, R.J.; MELO, L.E.H. Experimental swainsonine poisoning in goats ingesting *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* (Convolvulaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, p. 409-414, 2007.

- BARBOSA, R.C.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; LIMA, E.F.; BARROS, S.S.; GIMENO, E.J.; MOLYNEUX, R.J.; GARDNER, D.R. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon**. v. 47, p. 371-379, 2006.
- BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Vallée, São Paulo, p.21-28. 2006
- BEDIN, M; COLODEL, EM; GIUGLIANI, R; ZLOTOWSKI, P; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Urinary oligosaccharides: A peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning. **Toxicon**. v. 53, p. 591-594, 2009.
- BEDIN, M.; COLODEL, E.M.; VIAPIANA, M.; MATTE, U.; DRIEMEIER, D.; GIUGLIANI, R. Alpha-mannosidase activity in goats fed *Sida carpinifolia*. **Experimental and Toxicology Pathology**. v. 62, p. 191-195, 2010.
- BEZERRA JÚNIOR, P.S.; RAYMUNDO, D.L.; SPANAMBERG, A.; CORRÊA, A.M.R.; BANGEL JÚNIOR, J.J.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, p. 220-228, 2009.
- BEAUDET, A.L. Disorders of glycoprotein degradation: mannosidosis, fucosidosis, sialidosis ad aspartylglycosaminuria. In: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.A.S.; GOLDSTEIN J.L. & BROWN M.S. (Eds), **The Metabolic Basis of Inherited Diseases**. 5th ed. McGraw-Hill: New York. p. 788-802. 1983.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J.C; SCHUMACHER, U. **Lectin Histochemistry**. 5th ed. Bios Scientific Publishers: Oxford. p. 1-17. 1997.

- COLEGATE, S.M.; DORLING, P.R.; HUXTABLE, CR. A spectroscopic investigation of swainsonina: an alfa-mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. **Australian Journal of Chemical**. v. 32, p. 2257-2264, 1979.
- COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; LORETTI, A.P.; GIMENO, E.J.; TRAVERSO, S.D.; SEITZ, A.L.; ZLOTOWSKI, P. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22, p. 51-57, 2002a.
- COLODEL, E.M.; GARDNER, D.R.; ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D. 2002. Identification of Swainsonine as a glycoside inyibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. **Veterinary & Human Toxicology**. v. 44, p. 177-178, 2002b.
- COLODEL, E.M. Intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos. 2005, 88p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- CRAWLEY, A.C.; JONES, M.Z.; BONNING, L.E.; FINNIE, J.W.; HOPWOOD, J.J. Alpha-mannosidosis in the guinea pig: a new animal model for lysosomal storage disorders. **Pediatric Research**. v. 46, p. 501-509, 1999.
- CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 2ª. ed. Civilização Brasileira: Rio de Janeiro, 1982.
- DAMIR, H.A.; ADAM, S.; TARTOUR, G. The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. **Veterinary & Human Toxicology**. v. 29, p. 316-319, 1987.
- DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F.; GARDNER, D.R.; MEDEIROS, R.M.T.; BARROS, S.S.; ANJOS, B.L.; LUCENA, R.B. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. **Toxicon**. v. 49, p.111-116, 2007.

- DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; GIMENO, E.J.; BARROS, S.S. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* in goats. **Veterinary Pathology**. v. 37, p. 153-159, 2000.
- FURLAN, F.H.; LUCIOLI, J.; VERONEZI, L.O.; TRAVERSO, S.D.; GAVA, A. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, p.57-62, 2008.
- FURLAN, FH; LUCIOLI, J; VERONEZI, L.O; MEDEIROS, A; BARROS, S.S.; TRAVERSO, S.D.; GAVA, A. Spontaneous lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in cattle. **Veterinary Pathology**. v. 46, p.343-347, 2009.
- GAVA, A.; SOUSA, R.S.; de DEUS, M.S.; PILATI, C.; CRISTANI, J.; MORI, A.M.; NEVES, D.S. *Phalaris angusta* (Gramineae) como causa de enfermidade neurológica em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 19, p.35-38, 1999.
- GODOY, G.S.; CASTRO NETTO, A.; MOMO, C.; DUNE, A.C.; ÁVILA, L.G.; ALESSI, A.C.; MARQUES, L.C.; CASTRO, M.B. Intoxicação natural por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, suplemento, p. 25, 2005.
- GOLDSTEIN, I.J., HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. v. 35, p. 127-340, 1978.
- HARTLEY, W.J; JAMES, L.F. Fetal and maternal lesions in pregnant ewes ingesting Locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **American Journal of Veterinary Reserch**. v. 36, p.825-826, 1975.

- HARTMUT, F. **Advances in Lectin Research**. Vol.1. Springer-Verlag: Berlin, p.70-77. 1991.
- HEALY, P.J.; HARPER, P.A.; DENNIS, J.A. Phenotypic variation in bovine alpha-mannosidosis. **Research in Veterinary Science**. v. 49, p.82-84, 1990.
- HENRIQUES, A.T.; SIQUEIRA, N.; SCHAPOVAL, E.E.S.; GUTERRES, S.; DALLA COSTA, T.C.T. Análise farmacognóstica preliminar e atividade antiinflamatória das folhas de *Sida carpinifolia* (L.f.) K. Schum., Malvaceae (Parte I). **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 70, p. 55-58, 1989.
- JAMES, L.F., Van KAMPEN, K.R., JOHNSON, A.E. Physiopathologic changes in locoweed poisoning of livestock. **American Journal of Veterinary Research**. v. 31, p. 663-672, 1970.
- JAMES, L.F. Lesions in neonatal lambs resulting from maternal ingestion of Locoweed. **The Cornell Veterinarian**. v. 61, p. 667-670, 1971.
- JAMES, L.F. Effect of Locoweed on fetal development: preliminary study in sheep. **American Journal of Veterinary Research**. v. 33, p. 835-840, 1972.
- JAMES, L.F., NIELSON, D. Locoweeds: assessment of the problem on western U.S. rangelands. In: JAMES, L.F. RALPHS, M.H., NIELSON, D.B. **The Ecology and Economic Impact of Poisonous Plants on Livestock Production**. Westview Press: Boulder, p. 171-180, 1988.
- JAMES, L.F.; PANTER, K.E; NIELSEN, D.B; MOLYNEUX, R.J. The effect of natural toxins on reproduction in livestock. **Journal of Animal Science**. v. 70, p. 1573-1579, 1992.

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

JOLLY, R.D. Mannosidosis of Angus Cattle: a prototype control program for some genetic diseases. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**. v. 19, p. 1-21, 1975.

JOLLY, R.D.; DODDS, W.J.; RUTH, G.R.; TRAUNER, D.B. Screening for genetic diseases: principles and practice. JOLLY, R.D. Mannosidosis of Angus Cattle: a prototype control program for some genetic diseases. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**. v. 25, p. 245-276, 1981.

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

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

KINGSBURY J.M. **Poisonous Plants of the United States and Canada**. Prentice-Hall, Inc.: Englewood Cliffs, New Jersey, p. 305-311. 1964.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D.G. 2000. **Plantas Infestantes e Nocivas**. BASF S.A.: São Bernardo do Campo, São Paulo, Tomo III, p. 137-172. 2000.

LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**. v. 33, p. 25-131, 2003.

- LIMA, M.C.J.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosderma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**. v. 55, p. 320-324, 2010.
- LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 25, p. 250-264, 2005.
- LORENZI, H. 2000. **Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 5^a ed. Plantarum Ltda, Nova Odessa, SP. 339p.
- LORETTI, A.L.P.; COLODEL, E.M.; GIMENO, E.J.; DRIEMEIER, D. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**. v. 35, p. 434-438, 2003a.
- LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; CORRÊA, A.M.R.; BANGEL JÚNIOR, J.J.; FERREIRO, L. Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 15, p. 123-132, 2003b.
- LUTZENBERGER, L.C. Revisão da nomenclatura e observações sobre as Angiospermas citadas na obra de Manuel Cypriano D'Avila: "Da Flora Medicinal do Rio Grande do Sul". Porto Alegre, Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da UFRGS, **Dissertação**. 1985.
- MACÊDO, J.T.S.A. Doutorando em Patologia Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- MAENHOUT, T.; KINT, J.A.; DACREMONT, G.; DUCATELLE, R.; LEROY, J.G.; HOORENS, J.K. Mannosidosis in a litter of Persian cats. **Veterinary Record**. v. 122, p. 351-354, 1988.

- MAXIE, M.G.; YOUSSEF, S. Nervous system. In: MAXIE, M.G. (Ed.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. St Louis: Elsevier, v. 1, chap. 3, p. 283-455. 2007.
- MÉNDEZ, M. Del C.; RIET-CORREA, F. **Plantas Tóxicas e Micotoxícoses**. Editora e Gráfica Universitária, Pelotas, RS. 298p. 2008.
- MOLYNEUX, R.J.; JAMES, L.F. Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Science**. v. 216, p. 190-191, 1982.
- MONSIGNY, M.; ROCHE, A.C.; SENE, C.; MARGET-DOMMA, R. & DELMOTTE, F. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates?. **European Journal of Biochemistry**. v. 104, p. 147, 1980.
- MOREMEN, K.W. Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1573, p. 225-235, 2002.
- MUNTZ, F.H.; BONNING, L.E.; CAREY, W.F. Alpha-mannosidosis in a guinea pig. **Laboratory Animal Science**. v. 49, p. 424-6, 1999.
- OCKERMAN, P.A. Deficiency of beta-galactosidase and alpha-mannosidase-primary enzyme defects in gargoylism and a new generalized disease? **Acta paediatrica Scandinavica. Supplement**. v. 177, p. 35-6, 1967.
- OLIVEIRA, L.G.S.; PEDROSO, P.M.O.; BITENCOURT, A.P.G.; FERREIRA, H.H.; WATANABE, T.T.N.; GOMES, D.C.; DRIEMEIER, D. 2009. Intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. XIV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Águas de Lindóia, SP. (Resumo).

- OSWEILER, G.D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, 526p.
- PAGANINI FILHO, W.S.; TIRAPELLI A.C.N.; PEREIRA T.G.; WOUTERS A.T.B.; WOUTERS, F. 2008. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em ovinos. Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, 28 jun. a 03 jul., Campo Grande, MS. (Resumo).
- PAULOVICH, F.B.; PORTIANSKY, E.L.; GIMENO, E.J.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M. del C.; RIET-CORREA, F. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. **Journal Veterinary Medicine Series A**. v. 49, p. 473-477, 2002.
- PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L.; BANDARRA, P.M.; RAYMUNDO, D.L.; DRIEMEIER, D. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, p. 213-218, 2007.
- PEDROSO, P.M.O.; VON HOHENDORF, R; OLIVEIRA, L.G.S.; SCHMITZ, M.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in fallow deer (*Dama dama*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 40, p. 583-585, 2009a.
- PEDROSO, P.M.O.; COLODEL, E.M.; PESCADOR, C.A.; ARRUDA, L.P.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, p. 899-904, 2009b.
- PFISTER, J.A.; STEGELMEIER, B.L.; GARDNER, D.R.; JAMES, L.F. Grazing of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) by cattle and horses in Arizona. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 2285-2293, 2003.
- PIENAAR, F.M.; KELLERMAN, T.S.; BASSON, P.A.; JENKINS, W.L. & VAHRMEJER, J. Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum*

kwebense N.E. Br. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 43, p. 67-74, 1976.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; HINCHCLIFF K.W. 2002. **Clínica Veterinária**. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.

RECH, R.R.; RISSI, D.R.; RODRIGUES, A.; PIEREZAN, F.; PIAZER, J.V.M.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, p. 183-189, 2006.

RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas e micotoxinas que afetam a reprodução em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Biológico**. v. 69, p. 63-68, 2007.

SCHNEIDER, M.J.; UNGEMACH, F.S.; BROQUIST, H.P.; HARRIS, T.M. (1S,2R8R8 α R)-1,2,8-trihydroxyoctahydroindolizine (swainsonine), an α -mannosidase inhibitor from *Rhizoctonia leguminicola*. **Tetrahedron**. v. 39, p. 29-32, 1983.

SEITZ, A.L.; COLODEL, E.M.; SCHMITZ, M.; GIMENO, E.J.; DRIEMEIER, D. Use de lectin histochemistry to diagnose *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in sheep. **Veterinary Record**. v. 156, p. 386-388, 2005a.

SEITZ, A.L.; COLODEL, E.M.; BARROS, S.S.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 25, p. 15-20, 2005b.

SIM, K.L.; PERRY, D. Analysis of swainsonine and its early metabolic precursors in cultures of *Metarhizium anisopliae*. **Glicoconjugate Journal**. v. 14, p. 661-668, 1997.

SOUSA, R.S.; IRIGOYEN, L.F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 19, p. 116-122, 1999.

STEGELMEIER, B.L.; MOLYNEUX, R.J.; ELBEIN, A.D.; JAMES, L.F. The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. **Veterinary Pathology**. v. 32, p. 289-298, 1995.

ZACHARY, J.F. Nervous system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier, chap. 14, p. 833-971. 2009.