

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

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES
ENCEFÁLICAS RELACIONADAS A HEPATOPATIAS TÓXICAS EM
BOVINOS**

Angelica Terezinha Barth Wouters

Porto Alegre

2013

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

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES
ENCEFÁLICAS RELACIONADAS A HEPATOPATIAS TÓXICAS
EM BOVINOS**

Autor: Angelica Terezinha Barth Wouters

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Patologia Veterinária.

Orientador: Dr. David Driemeier

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

WOUTERS, ANGELICA TEREZINHA BARTH
CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES
ENCEFÁLICAS RELACIONADAS A HEPATOPATIAS TÓXICAS EM
BOVINOS / ANGELICA TEREZINHA BARTH WOUTERS. -- 2013.
48 f.

Orientador: DAVID DRIEMEIER.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2013.

1. Encefalopatia hepática. 2. Hepatopatia aguda.
3. Neuropatologia. 4. Astrócitos. 5. Imuno-
histoquímica . I. DRIEMEIER, DAVID , orient. II.
Título.

ANGELICA TEREZINHA BARTH WOUTERS

CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES ENCEFÁLICAS
RELACIONADAS A HEPATOPATIAS TÓXICAS EM BOVINOS

Aprovada em 12 de agosto de 2013

APROVADO POR

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz
Membro da Comissão

Profª. Dra. Luciana Sonne
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da VIDA, pela família e por todas as Graças e oportunidades que me concedeu... talvez eu nem mereça tanto.

Aos meus pais, Leo Paulo e Margaretha, pelo exemplo de vida e de fé em Deus que passaram a seus filhos. Vocês sempre foram e continuam sendo um porto seguro para a gente.

Aos meus irmãos Matias, José, Maria, Francisca, Irmã Lioba, Gabriel e Hugo... amo vocês!

Ao Flademir, meu sempre companheiro de jornada, pelo amor, pelo carinho, pela parceria e pela paciência.

Aos nossos filhos queridos Lídia, Daniel, Pedro e João Paulo, pela compreensão e pelo apoio nesse período em que submetemos vocês a deixarem sua terra natal, sua casa e seus amigos para nos acompanhar. Aprendemos com vocês, a cada dia.

À família do Flademir; Aldo e Rumilda, que sempre me acolheram como uma filha; Elizete e Jorge, mais que cunhados - são amigos verdadeiros - e seus filhos queridos, Henrique e Rafael. Nossa temporada em Porto Alegre permitiu que estivéssemos mais próximos... foi muito bom!

Ao meu orientador, Dr. David Driemeier, pela oportunidade em “dose dupla”, pelo exemplo de trabalho e de paixão pela Patologia, pela dedicação e pela amizade.

Aos colegas e para sempre amigos do SPV-UFRGS; colegas de pós-graduação, professores, funcionários, residentes, estagiários... Se eu citar nomes corro um grande risco de esquecer alguém, o que não seria justo. TODOS foram muito importantes para mim nesse período. Quero, em especial, agradecer aos meus parceiros de “Semana de N”, Tatiane Terumi e Gabriel Frainer, vocês foram mesmo grandes parceiros.

Aos colegas e alunos da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFENAS, pela amizade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado... mais uma vez agradeço ao meu orientador; sem seu auxílio não conseguiria essa bolsa.

RESUMO

As plantas tóxicas continuam entre as principais causas de morte em bovinos no Brasil. Elas apresentam efeito relativamente específico sobre os tecidos e/ou sistemas. Várias plantas tóxicas do Brasil causam dano hepático, de forma aguda ou crônica, muitas vezes acompanhado de encefalopatia hepática, cuja patogenia ainda não havia sido elucidada nos casos de hepatopatia tóxica aguda em bovinos. O presente estudo teve como objetivo caracterizar microscopicamente as alterações encefálicas relacionadas a hepatopatias tóxicas em bovinos e resultou em três artigos. O primeiro deles descreve alterações encefálicas histológicas em bovinos com intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* e suas características na avaliação imuno-histoquímica (IHQ), com emprego dos anticorpos anti-proteína S100 e anti-proteína glial fibrilar ácida. No segundo artigo são caracterizadas as alterações encefálicas de 22 bovinos intoxicados natural ou experimentalmente por cinco espécies de planta de ação hepatotóxica aguda ou pela ingestão de *P. flavipes*, com avaliação de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), histoquímicas de ácido periódico de Shiff (PAS) e lectinas e pelas provas de IHQ usando os anticorpos anti-S100, anti-GFAP e anti-vimentina. Neste artigo são evidenciadas alterações relevantes em astrócitos, tanto da substância branca quanto da cinzenta e se demonstra serem os mesmos o principal alvo de lesão na hepatopatia tóxica aguda em bovinos, evidenciado pela IHQ. As técnicas histoquímicas citadas não apresentaram resultados promissores, por isso não são apresentadas no Artigo 2. No terceiro artigo é realizada avaliação comparativa de encéfalos de bovinos intoxicados por *Senecio* sp. com uso das mesmas técnicas e que demonstrou não haver alterações significativas em astrócitos e estruturas vasculares encefálicas, reiterando a patogenia anteriormente proposta, de que a degeneração esponjosa, alteração histológica encefálica amplamente descrita nessa intoxicação, é caracterizada por edema intramielínico.

ABSTRACT

Toxic plants remain among the major causes of death in cattle in Brazil. They have relatively specific effects on animal tissues or systems. Several Brazilian poisonous plants cause acute or chronic liver damage, often accompanied by hepatic encephalopathy, the pathogenesis of which was not yet elucidated in cases of acute toxic liver disease in cattle. This study resulted in three articles. The first describes histological findings in brains of cattle poisoned by *Cestrum intermedium* and their immunohistochemical characteristics using the anti-protein S100 and anti-glial fibrillary acidic protein markers. The second article characterizes changes in the brain from 22 cattle natural or experimentally poisoned by five plant species with acute hepatotoxic effects or by the ingestion of *P. flavipes* larvae. Hematoxylin and eosin stained slides of cerebrum, brainstem and cerebellum were evaluated, as well histochemical preparations stained with periodic acid Schiff or lectins and immunohistochemical evaluation employing anti-S100, anti-GFAP and anti-vimentin markers. These histochemical techniques did not show promising results, so these are not shown in the second article. Relevant changes were observed in astrocytes from white and gray matter, presenting these cells as the main target of injury in acute toxic liver disease in cattle. The third paper presents a comparative evaluation of the brains of ten cattle poisoned by *Senecio* sp. using the same techniques. There were no significant changes in astrocytes and brain vascular structures, backing up the pathogenesis previously proposed; that the histological brain changes identified as spongy degeneration, largely described in this poisoning, are characterized by intramyelinic edema.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. ARTIGO 1. “INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA POR <i>Cestrum intermedium</i> EM BOVINOS NO SUDOESTE DO ESTADO DO PARANÁ”	9
3. ARTIGO 2. “CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES ENCEFÁLICAS RELACIONADAS A HEPATOPATIA TÓXICA AGUDA EM BOVINOS”	15
4. ARTIGO 3. “CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS ALTERAÇÕES ENCEFÁLICAS EM BOVINOS COM HEPATOPATIA TÓXICA POR <i>Senecio</i> sp.”	33
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

Apesar do avanço nas tecnologias de produção de alimentos para bovinos e da prática do confinamento, as plantas tóxicas continuam entre as principais causas de morte em bovinos no Brasil (TOKARNIA et al., 2012).

As plantas tóxicas em geral têm efeito relativamente específico sobre tecidos e/ou sistemas; no Brasil há relatos de intoxicação de bovinos por plantas com ação sobre músculo cardíaco (PAVARINI et al., 2011; SOARES et al., 2011; TOKARNIA et al., 2012), sistema nervoso central (ARMIÉN et al., 2007; PEDROSO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012), fígado (GAVA et al., 1991; 1996; DRIEMEIER et al., 1999; COLODEL et al., 2003; TRAVERSO et al., 2004; RAYMUNDO et al., 2009; BANDARRA et al., 2009; BARROS et al., 2010; VARASCHIN et al., 2011; TOKARNIA et al., 2012) e outros.

Os efeitos das plantas hepatotóxicas podem ser agudos ou crônicos. Em geral elas são classificadas em três grandes grupos: plantas que induzem necrose hepática aguda; as que induzem fibrose hepática; e as que causam fotossensibilização (SANTOS et al., 2008).

Animais com lesões hepáticas difusas graves geralmente apresentam manifestações clínicas de encefalopatia hepática (SUMMERS et al., 1995). As alterações encefálicas induzidas por plantas hepatotóxicas crônicas têm sido associadas a hiperamonemia (BARROS et al. 1987; MÉNDEZ, RIET-CORREA e SCHILD, 1987; BARROS et al., 1992; SANTOS et al., 2008; LUCENA et al., 2010). No grupo dessas plantas são mais importantes as espécies que contêm como princípio ativo alcaloides pirrolizidínicos. Estes são compostos que apresentam nitrogênio, usualmente no anel heterocíclico, e geralmente são tóxicos (SANTOS et al., 2008; LUCENA et al., 2010); induzem alterações histologicamente caracterizadas por degeneração esponjosa (= "*status spongiosus*") no sistema nervoso central, mais pronunciadas na substância branca, sendo observadas em mesencéfalo, base do encéfalo, pedúnculos cerebelares e na junção entre substância cinzenta e branca (BARROS, 2010).

Em casos de intoxicação por diferentes espécies de plantas de ação hepatotóxica aguda estudadas em bovinos no Brasil tem sido observados danos encefálicos, em alguns casos inclusive com alterações macroscópicas e achados histológicos

(TRAVERSO et al., 2004; VARASCHIN et al., 2011), cuja patogenia ainda não estava definida.

O presente trabalho tem por objetivo descrever as alterações encontradas em cortes de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo de bovinos intoxicados pelas plantas de ação hepatotóxica aguda *Cestrum corymbosum*, *Cestrum intermedium*, *Dodonaea viscosa*, *Trema micrantha* e *Xanthium cavanillesii* e pela ingestão de larvas do inseto *Perreyia flavipes*, incluindo achados histológicos em H.E., da histoquímica de PAS e de lectinas e das provas imuno-histoquímicas usando os anticorpos anti-S100, anti-GFAP e anti-vimentina. Inclui ainda resultados da avaliação comparativa das alterações nas áreas encefálicas correspondentes com emprego dessas mesmas técnicas em casos de intoxicação por *Senecio* sp., também em bovinos.

ARTIGO 1.

Neste item é apresentado o artigo “**Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná**”, publicado na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná¹

Angelica T.B. Wouters², Fabiana M. Boabaid², Tatiane T.N. Watanabe², Paulo M. Bandarra², Gabriel L.F. Correa², Flademir Wouters², Raquel M. Mafessoni³ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Wouters A.T.B., Boabaid F.M., Watanabe T.T.N., Bandarra P.M., Correa G.L.F., Wouters F., Mafessoni R.M. & Driemeier D. 2013. [Spontaneous poisoning by *Cestrum intermedium* in cattle in Southwest of Paraná, Brazil.] Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(1):47-51. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

Outbreaks of *Cestrum intermedium* poisoning affected cattle from dairy herds in Salgado Filho, Southwest of Paraná, southern Brazil, with death of sixteen from 72 animals of four small properties. The onset of the acute clinical signs and death within 24h were reported. High animal density and many shrubs identified as *C. intermedium* that showed signs of having been consumed by the animals were noticed in all farms. Two animals were necropsied and the most important findings were congested conjunctival and vulvovestibular mucosae; hemorrhages and enhanced lobular pattern in the liver; hemorrhages, congestion and edema in the lung; splenic and brain congestion, and multifocal hemorrhages in the heart. Tissue samples from these two bovines were evaluated. Histological lesions were marked in the liver, such as severe centrilobular necrosis and hemorrhage, what is indicative of acute toxic liver disease. In the brain tissue, astrocytic changes were observed in the white matter of the cerebrum and cerebellum, and in the gray matter of the cerebellum. They were characterized by cell swelling with large and eosinophilic cytoplasm, pyknotic and sometimes eccentric nucleus. These astrocytic changes features were demonstrated by immunohistochemical techniques using the anti-S100 protein and anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP), with a strongly positive immunostaining for both antibodies. The paper aims to emphasize on neurological lesions of acute hepatotoxicity in cattle.

INDEX TERMS: Poisonous plants, *Cestrum intermedium*, Solanaceae, liver, plant poisoning, diseases of cattle, immunohistochemistry.

RESUMO.- São descritos surtos de intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos leiteiros do Município de Salgado Filho, sudoeste do Estado do Paraná, com morte de dezesseis bovinos de um total de 72 de quatro pequenas propriedades. O histórico obtido nessas propriedades incluía curso clínico agudo, com morte em menos de 24 horas. Em todas foram observadas elevada lotação por

área com escassa pastagem disponível e grande quantidade de plantas arbustivas identificadas como *C. intermedium* e com sinais de terem sido consumidas pelos animais. Dois bovinos foram necropsiados e os achados mais importantes foram congestão de mucosas conjuntivais e vulvovestibular; hemorragias e evidenciação do padrão lobular no fígado; hemorragia, congestão e edema pulmonares; congestão esplênica e encefálica, além de hemorragias multifocais no coração. Amostras de tecidos desses bovinos foram avaliadas, com alterações histológicas importantes no fígado, caracterizadas por necrose acentuada de hepatócitos e hemorragia, indicativas de hepatopatia tóxica aguda e, no encéfalo, foram observadas alterações astrocitárias em substância branca de cérebro e cerebelo e na substância cinzenta do cerebelo, caracterizadas por tumefação celular

¹ Recebido em 28 de setembro de 2012.

Aceito para publicação em 19 de outubro de 2012.

² Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Médica Veterinária, Rua Pato Branco 482, Francisco Beltrão, PR 85601-350, Brasil.

com citoplasma amplo e eosinofílico, núcleo picnótico, ora excêntrico. Essas alterações astrocíticas foram evidenciadas pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ), com imunomarcagem fortemente positiva para os anticorpos anti-proteína S100 (anti-S100) e anti-proteína glial fibrilar ácida (anti-GFAP). O trabalho visa enfatizar em lesões encefálicas relacionadas à hepatotoxicidade aguda em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, *Cestrum intermedium*, Solanaceae, fígado, intoxicação por plantas, doença de bovinos, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

Cestrum intermedium, planta arbustiva a arbórea pertencente a um gênero tipicamente americano da Família Solanaceae, está presente no Brasil, de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. A espécie ocorre tanto no interior quanto em borda de matas e também em locais antropizados (Soares et al. 2007), como beiras de cercas, áreas destinadas a pastagens e em terrenos baldios (Lorenzi 2008b). É conhecida pelos nomes populares de “coerana”, “mata-boi” e “peloteira preta” (Kissmann & Groth 2000, Lorenzi 2008b).

C. intermedium causa intoxicação em bovinos em situações de escassez de forragem, principalmente no inverno, em períodos de seca ou quando há lotação animal elevada nas pastagens (Tokarnia et al. 2012). É considerada a planta tóxica de maior importância no extremo oeste e no noroeste do Estado de Santa Catarina (Gava 1993, Gava et al. 1996). Furlan et al. (2008) descreveram um surto de intoxicação espontânea por *C. intermedium* em bovinos no Município de Jupiá, oeste de Santa Catarina. Casos de intoxicação são também descritos em bovinos no Rio Grande do Sul, na região da encosta da Serra Gaúcha (Bandarra et al. 2009).

O quadro clínico da intoxicação por *C. intermedium* é curto, de aproximadamente 12 a 48 horas (Gava et al. 1996) e há observação de curso clínico até inferior a 12 horas (Bandarra et al. 2009). As manifestações clínicas são de insuficiência hepática aguda, com anorexia, atonia ruminal, fezes escassas, ressecadas e com muco e/ou sangue, congestão conjuntival (Gava et al. 1996), tremores musculares, incoordenação (Gava et al. 1996, Furlan et al. 2008, Bandarra et al. 2009), agressividade (Furlan et al. 2008, Bandarra et al. 2009), pressão da cabeça contra obstáculos, cabeça voltada para o flanco, gemidos (Gava et al. 1996), decúbito esternal (Gava et al. 1996, Furlan et al. 2008) e lateral (Furlan et al. 2008, Bandarra et al. 2009), movimentos de pedaleira (Gava et al. 1996, Furlan et al. 2008), opistótono e morte (Gava et al. 1996).

Os achados de necropsia mais importantes em bovinos intoxicados por *C. intermedium* estão no fígado, o qual apresenta evidência do padrão lobular (Furlan et al. 2008, Bandarra et al. 2009) e pode ter seu volume aumentado (Bandarra et al. 2009). São descritos edema da parede da vesícula biliar (Gava et al. 1996, Bandarra et al. 2009) e da porção inicial do duodeno (Gava et al. 1996), retração do globo ocular por desidratação, hemorragias em tecido subcutâneo (Bandarra et al. 2009), coração (Gava et al. 1996, Bandarra et al. 2009), intestino grosso (Gava et al.

1996), timo, tireoide, serosa do rúmen, omento e mesentério (Bandarra et al. 2009) e ressecamento do conteúdo de omaso, cólon e reto (Gava et al. 1996).

Há, no Brasil, diversas espécies de plantas tóxicas cuja ingestão resulta em lesão hepática caracterizada histologicamente por necrose acentuada de hepatócitos, incluindo *Cestrum* spp. e outras plantas hepatotóxicas. Além das plantas, deve ser também considerada a possibilidade de intoxicação por larvas do inseto *Perreyia flavipes*, descrita em bovinos e ovinos no Sul do Brasil, com ingestão das larvas nas pastagens, principalmente no período de maio a setembro (Soares et al., 2008, Raymundo et al. 2009).

São descritos quatro surtos de intoxicação por *C. intermedium* em bovinos do sudoeste do Estado do Paraná, com avaliação histológica dos tecidos e realização da técnica de IHQ para os anticorpos anti-S100 e anti-GFAP em cérebro e cerebelo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas avaliação macroscópica e histológica de tecidos colhidos na necropsia de dois bovinos, fêmeas, mestiças, uma com aproximadamente 6 anos (Propriedade A) e outra com 1 ano e 4 meses (Propriedade B) e visita a quatro propriedades (Propriedades A, B, C e D) para investigação da ocorrência de agentes hepatotóxicos e coleta de dados.

Cortes de 3 µm de espessura foram efetuados dos blocos em parafina de cérebro e cerebelo para a realização da técnica de IHQ, pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase, usando os anticorpos primários (anti-GFAP) e (anti-S100). O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos em solução 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.), em metanol, durante 10 minutos. Para a recuperação antigênica, utilizou-se tampão tris EDTA, pH 9,0, e tampão citrato, pH 6,0, em panela de pressão a 96°C, por 40 minutos (anticorpo policlonal anti-GFAP, Z0334, DakoCytomation, diluição 1:500 e anticorpo policlonal anti-S100, Z0311, DakoCytomation, diluição 1:200, respectivamente). Os anticorpos primários foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS), aplicados nas lâminas e incubadas em câmara úmida por 14-16 horas (“overnight”) a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation), 20 minutos cada etapa. A reação para GFAP foi revelada com 3,3-diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation) e, para S100, foi usado o cromógeno VECTOR®NovaRed. Para a contracoloração utilizou-se hematoxilina de Harris, seguida da montagem em Entellan®. Como controles para avaliação das imunomarcações anti-GFAP e anti-S100 foram usados cortes de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo de bovinos adultos da rotina de diagnóstico do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) sem alterações hepáticas e/ou encefálicas e como controle negativo cortes correspondentes incubados apenas com PBS.

RESULTADOS

Quatro pequenas propriedades localizadas no Município de Salgado Filho, sudoeste do Paraná, apresentaram mortalidade de bovinos leiteiros. Na Propriedade A morreram, em um período de 40 dias do inverno de 2008, quatro animais adultos de um plantel de 19 bovinos. O plantel era mantido em 3,0 ha de campo e aproximadamente 1,0 ha de pastagem cultivada, com fornecimento de cana-de-açúcar e

forragem em cocho. As manifestações clínicas observadas incluíram escoicear do ventre e movimentos de pedagem, já em decúbito lateral, com morte em menos de 24 horas. Na necropsia foram constatados bom estado corporal, mucosas conjuntivais e vulvovestibular, fígado, baço e cérebro congestos e hemorragias focais em pulmões e coração.

Na Propriedade B haviam morrido quatro de 28 bovinos de um mesmo piquete, também no inverno de 2008 e, em 2009, morreu mais uma vaca, com manifestações clínicas semelhantes. Estas incluíam fraqueza, dispnéia, permanência em estação com o pescoço estirado, balançar da cabeça e berros fortes. O período da observação dos primeiros sinais clínicos até a morte foi inferior a 24 horas em todos os casos. No bovino necropsiado havia evidência do padrão lobular no fígado, vesícula biliar repleta; pulmões congestos e edematosos, linfonodos mediastínicos aumentados de volume, baço congesto e, no coração, havia hemorragias multifocais subendocárdicas e subepicárdicas.

Na Propriedade C, morreram, em um período de 72 horas, cinco de 18 bovinos em outubro de 2011, sendo quatro fêmeas de 7-8 meses de idade e um macho, com relato de evolução clínica de aproximadamente 12 horas até a morte. Os animais estavam em um campo com pasto escasso. Na quarta propriedade (Propriedade D), foram encontradas mortas duas vacas de um plantel de 7 bovinos.

Em visita às propriedades foi verificada grande quantidade de plantas da espécie *C. intermedium* no local em que os bovinos eram mantidos, com sinais de folhas consumidas (Fig.1).

Na avaliação histológica do fígado do bovino da Propriedade A foi observada necrose aguda difusa acentuada de hepatócitos, associada a hemorragia acentuada (Fig.2), poupando apenas hepatócitos da periferia dos lóbulos. Havia discreto infiltrado inflamatório nas áreas de necrose, composto predominantemente por neutrófilos, e ocasionais células de Kupffer apresentavam citoplasma carregado de pigmento granular acastanhado. Foram ainda observadas hemorragia multifocal nos pulmões e congestão no baço. No outro bovino (Propriedade B) foi também observada necrose aguda acentuada de hepatócitos, no entanto, com distribuição centrolobular e havia vacuolização difusa



Fig.1. Arbusto de *Cestrum intermedium* em brotação. Observam-se galhos cujas folhas foram consumidas.

discreta do citoplasma dos hepatócitos periféricos à necrose, entremeados por ocasionais glóbulos eosinofílicos. Hemorragia e infiltrado inflamatório estavam também presentes no fígado, com intensidade e distribuição similares ao primeiro animal. Na substância branca do cérebro e do cerebelo de ambos os bovinos foram observados astrócitos com citoplasma amplo e fraco e homoganeamente eosinofílico, núcleo retraído com cromatina densa, excêntrico em algumas células (Fig.3). Em alguns cortes havia também vacuolização arredondada multifocal discreta da substância branca. Astrócitos de Bergmann no cerebelo apresentavam aspecto semelhante aos astrócitos da substância branca. Havia ainda congestão difusa discreta a moderada no cérebro e no cerebelo dos dois bovinos e, no exame dos demais órgãos; hemorragia focal no miocárdio, congestão pulmonar, além de áreas de enfisema e atelectasia (Bovino Propriedade A); depleção linfóide moderada em linfonodo,

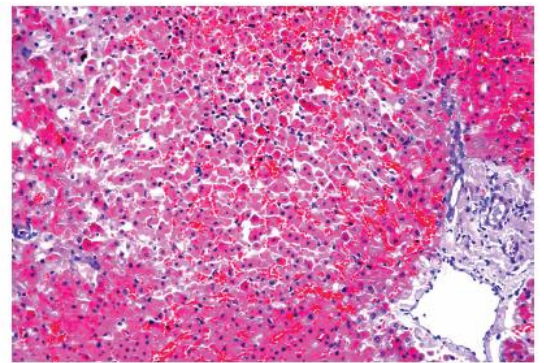


Fig.2. Fígado de bovino (Propriedade A) intoxicado por *Cestrum intermedium*. Observa-se necrose coagulativa acentuada de hepatócitos associada a hemorragia, poupando apenas hepatócitos periportais. Há discreto infiltrado inflamatório, composto predominantemente por neutrófilos. HE, obj.20x.

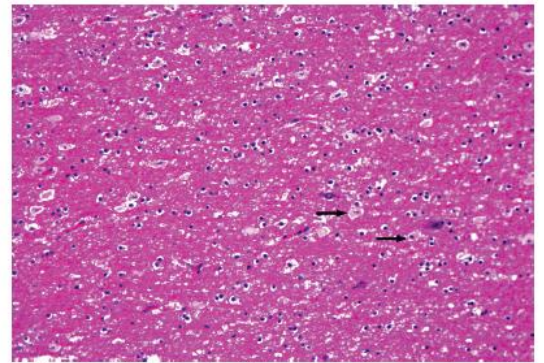


Fig.3. Telencéfalo de bovino (Propriedade B) intoxicado por *Cestrum intermedium*. Astrócitos da substância branca subcortical com citoplasma amplo, fraco e homoganeamente eosinofílico e núcleo retraído e excêntrico com cromatina densa (setas). HE, obj.20x.

necrose discreta em centros foliculares e hemossiderose difusa discreta no baço, congestão pulmonar e edema alveolar e intersticial acentuado (Bovino Propriedade B).

Na avaliação por IHQ, as alterações observadas em astrócitos na coloração de rotina foram evidenciadas nas imunomarcações anti-GFAP e anti-S100, com marcação citoplasmática positiva acentuada nos astrócitos da substância branca do cérebro e do cerebelo (Fig. 4) e os astrócitos de Bergmann, no cerebelo. Em vacúolos arredondados formados na substância branca, observados nos cortes submetidos ao anticorpo anti-S100, havia marcação positiva nas bordas, delimitando esses vacúolos.

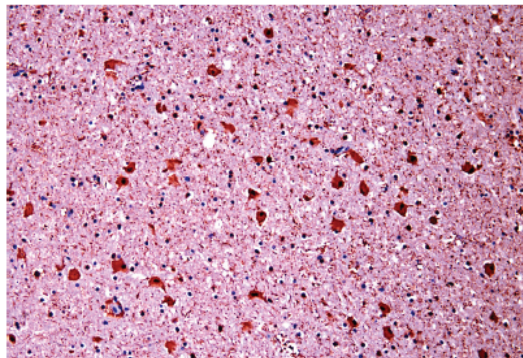


Fig.4. Imunomarcção anti-S100 em substância branca telencefálica de bovino (Propriedade B) intoxicado por *Cestrum intermedium*, evidenciando astrócitos com citoplasma amplo, fortemente marcado em castanho e núcleo retraído. Método da Estreptavidina-biotina-peroxidase. Cromógeno Vector Nova Red, contracoloração Hematoxilina de Harris, obj. 20x.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Cestrum intermedium, planta identificada como tóxica para bovinos em Santa Catarina e com grande importância no Extremo Oeste e no Noroeste desse Estado (Gava, 1993, Gava et al. 1996), foi a causa de intoxicação espontânea em bovinos no sudoeste do Estado do Paraná, caracterizada por insuficiência hepática aguda, com necrose acentuada de hepatócitos.

Em uma das propriedades foram encontrados bovinos mortos sem que sinais clínicos fossem percebidos. Provavelmente os animais tiveram manifestação clínica, porém breve e que não foi observada; o que indica rápida evolução para a morte. Bandarra et al. (2009) observaram curso clínico inferior a 12 horas em um surto de intoxicação natural por *C. intermedium* em bovinos. O quadro clínico de evolução aguda está relacionado à instalação de insuficiência hepática aguda e, na intoxicação por plantas com esse efeito, a taxa de mortalidade pode atingir 70 a 100 % (Riet-Correa et al. 2009).

As alterações histológicas foram constituídas por necrose acentuada de hepatócitos, com variação na extensão da lesão nos lóbulos dos fígados avaliados. Nos casos de evolução clínica mais rápida é esperada lesão difusa nos lóbulos, com morte em 12 a 24 horas após a ingestão da planta hepatotóxica, e predominantemente centrolobular naqueles de

evolução mais longa, isto é, superior a 24h. (Riet-Correa et al. 2009). No exame histológico em outros casos de intoxicação por *C. intermedium* são descritos no fígado necrose coagulativa centrolobular (Gava et al. 1996, Bandarra et al. 2009) e em zona intermediária a massiva, difusa, aguda e acentuada, acompanhada por congestão centrolobular (Gava et al. 1996) e degeneração vacuolar em hepatócitos adjacentes (Gava et al. 1996, Furlan et al. 2008, Bandarra et al. 2009).

O discreto infiltrado inflamatório observado nas áreas de necrose de hepatócitos foi interpretado como resposta do organismo às células necróticas. Bandarra et al. (2009) também descreveram infiltrado inflamatório discreto, composto por neutrófilos e macrófagos, nas áreas de necrose hepática, em espaços porta e lúmen de ductos biliares, além de hemorragia em coração, timo e tireoide e hemossiderose difusa moderada no baço.

Na propriedade B foi verificada doença clínica, no entanto, a conclusão diagnóstica só foi possível após constatação da alteração histológica de necrose acentuada de hepatócitos associada a hemorragia, lesão característica de hepatopatia tóxica aguda em ruminantes, aliada à confirmação "in loco" da ocorrência de *C. intermedium* em grandes quantidades nas áreas ocupadas por bovinos. Esse fato evidencia a importância do exame de necropsia, da colheita de amostras de órgãos e da realização do exame histológico para o diagnóstico. Muitas intoxicações por planta induzem alterações morfológicas mais ou menos características, sendo o exame histológico um meio complementar muito útil na confirmação diagnóstica (Tokarnia et al. 2012).

Os achados de evidênciação do padrão lobular do fígado e hemorragias multifocais a difusas em fígado e serosas na intoxicação por *C. intermedium* são também descritos em outras hepatopatias tóxicas agudas em bovinos no Brasil (Santos et al. 2008, Riet-Correa et al. 2009, Tokarnia et al. 2012), como na intoxicação por *C. corymbosum* (Gava et al. 1991, Varaschin et al. 2011), *C. laevigatum* (Döbereiner et al. 1969), *C. parqui* (Riet-Correa et al. 1986), *Dodonaea viscosa* (Colodel et al. 2003), *Myoporum laetum* (Méndez 1993), *Sesaea brasiliensis* (Canella et al. 1968), *Vernonia mollissima* (Döbereiner et al. 1976), *Vernonia rubricaulis* (Tokarnia & Döbereiner 1982, Brum et al. 2002) e *Xanthium strumarium*, também identificado como *Xanthium cavanillesii* (Méndez et al. 1998, Driemeier et al. 1999); de forma que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial. Dessas plantas, são registradas no estado do Paraná, além de *C. intermedium*, as plantas hepatotóxicas *C. corymbosum* (Kissmann & Groth 2000, Lorenzi 2008a), *Trema micrantha* (Lorenzi 2008b) *Xanthium strumarium* (Kissmann & Groth 2000, Tokarnia et al. 2012). Na intoxicação por larvas de *Perreyia flavipes* observam-se, além da necrose hepática, necrose linfóide em placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e baço (Soares et al. 2008, Raymundo et al. 2009). Doenças que cursam com manifestações neurológicas, como a raiva, devem também ser consideradas no diagnóstico diferencial da intoxicação por plantas de ação hepatotóxica. Outrossim, a visita a propriedades com suspeita e/ou casos de intoxicação, a verificação da presença da provável planta tóxica com evidências de ter sido consumida pelos animais e a coleta de dados clínicos e epidemiológicos são funda-

mentais para a diferenciação entre as diversas causas de hepatotoxicidade aguda de bovinos (Tokarnia et al. 2012).

Alterações histológicas foram observadas no encéfalo dos bovinos intoxicados por *C. intermedium* dos quais foram enviadas amostras para exame. Nas intoxicações por diferentes espécies de plantas hepatotóxicas de ação aguda estudadas em bovinos no Brasil tem sido observados danos encefálicos, em alguns casos inclusive com alterações macroscópicas e achados histológicos (Traverso et al. 2004, Varaschin et al. 2011), cuja patogenia não está definida até então. No entanto, nos presentes casos foram evidenciadas alterações degenerativonecroticas significativas em astrócitos de substância branca do cérebro e do cerebelo e nos astrócitos de Bergmann.

A técnica de IHQ foi empregada para avaliar melhor as alterações histológicas no encéfalo. Tanto a imunomarcagem anti-GFAP quanto a anti-S100 apresentaram marcação positiva acentuada na citoplasma de astrócitos, evidenciando essas alterações. Os achados indicam que, nos casos de encefalopatia hepática aguda, os astrócitos são alvo de lesão; eles apresentaram, além das características degenerativonecroticas, as proteínas S100 e GFAP, com marcação muito maior que em astrócitos de animais controle, não afetados por encefalopatia hepática aguda. Isto sugere o aumento da quantidade dessas proteínas e/ou da sua expressão nos astrócitos nos casos de encefalopatia hepática aguda.

Em bovinos da Região Sul do Brasil é frequente a ocorrência de encefalopatia relacionada a hepatopatia crônica, relacionada principalmente à ingestão de *Senecio* spp. (Rissi et al. 2007, Lucena et al. 2010), com manifestações clínicas neurológicas, consistentemente associadas à observação de alterações histológicas encefálicas descritas como degeneração esponjosa ("*status spongiosus*"), relacionadas a edema intramielínico (Barros, 2010). Mais estudos devem ser conduzidos para a caracterização das alterações encefálicas nos casos de hepatopatia tóxica aguda em bovinos.

REFERÊNCIAS

- Barros C.S.L. 2010. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino, p.183-290. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), Patologia Veterinária. Roca, São Paulo. 892p.
- Bandarra P.M., Bezerra Júnior P.S., Corrêa A.M.R., Pedrosa P.M.O., Raymundo D.L. & Driemeier D. 2009. Intoxicação natural por *Cestrum intermedium* em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 39(1):262-265.
- Brum K.B., Purisco E., Lemos R.A.A. & Riet-Correa F. 2002. Intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 22:119-128.
- Canella C.F.C., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1968. Intoxicação por *Seslea brasiliensis* Toledo em bovinos. *Pesq. Agrop. Bras.* 3:333-340.
- Colodel E.M., Traverso S.D., Seitz A.L., Oliveira E.N., Driemeier D. & Gava A. 2003. Spontaneous poisoning by *Dodonaea viscosa* (Salpindaceae) in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 45(3):147-148.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H. & Canella C.F. 1969. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht., a causa de mortandades em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agrop. Bras.* 4:165-193.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H. & Purisco E. 1976. *Vernonia mollissima*, planta tóxica responsável por mortandade de bovinos no Sul do Mato Grosso. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 11:49-58.
- Driemeier D., Irigoyen L.F., Loretto A.P., Colodel E.M. & Barros C.S.L. 1999. Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 19(1):12-18.
- Furlan F.H., Lucieli J., Borelli V., Faria Junior O.O., Rebelatto S.V., Gava A. & Traverso S.D. 2008. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Acta Scient. Vet.* 36(3):281-284.
- Gava A. 1993. Intoxicação por *Cestrum intermedium*, p.72-74. In: Riet-Correa F., Méndez M.C. & Schild A.L. (Eds), Intoxicações por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos. Hemisfério Sul, Pelotas. 340p.
- Gava A., Stolf L., Pilati C., Neves D.S. & Viganó L. 1991. Intoxicação por *Cestrum corymbosum* var. *hirsutum* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 11(3/4):71-74.
- Gava A., Stolf L., Varaschin M.S., Neves D.S., Tigre A.P. & Lesmann F. 1996. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6:7-20.
- Kissmann K.G. & Groth D. 2000. Plantas Infestantes e Nocivas. Vol.3. 2ª ed. BASF, São Paulo. 722p.
- Lorenzi H. 2008a. Árvores do Brasil. Vol.1. 5ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 384p.
- Lorenzi H. 2008b. Plantas Daninhas do Brasil. 4ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 640p.
- Lucena R.B., Rissi D.R., Maia L.A., Dantas A.F.M., Flores M.A., Nobre V.M.T., Riet-Correa F. & Barros C.S.L. 2010. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):447-452.
- Méndez M.C. 1993. Intoxicação por *Myoporium* spp., p.79-84. In: Riet-Correa F., Méndez M.C. & Schild A.L. (Eds), Intoxicações por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos. Hemisfério Sul, Pelotas. 340p.
- Méndez M.C., Santos R.C. & Riet-Correa F. 1998. Intoxication by *Xanthium cavanillesii* in cattle and sheep in Southern Brazil. *Vet. Hum. Toxicol.* 40(3):144-147.
- Raymundo D.L., Bezerra Junior P.S., Bandarra P.M., Santos A.S., Sonne L., Pavarini S.P., Corrêa A.M.R., Dias M.M. & Driemeier D. 2009. Intoxicação espontânea pelas larvas de *Perreyia flavipes* em bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Rural* 39(1):163-166.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C. & Pinheiro M.H. 1986. Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 6(4):111-115.
- Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Pfister J., Schild A.L. & Dantas A.F.M. 2009. Poisonings by Plants, Mycotoxins and Related Substances in Brazilian Livestock. UFCG, Campina Grande, PB. 246p.
- Rissi D.R., Rech R.R., Pierezan F., Gabriel A.L., Trost M.E., Brum J.S., Komers G.D. & Barros C.S.L. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 27:261-268.
- Santos J.C.A., Riet-Correa F., Simões S.V.D. & Barros C.S.L. 2008. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1):1-14.
- Soares E.L.C., Vignoli-Silva M. & Mentz L.A. 2007. O gênero *Cestrum* L. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesquisas, Botânica, São Leopoldo*, 58:263-281.
- Soares M.P., Quevedo P.S. & Schild A.L. 2008. Intoxicação por larvas de *Perreyia flavipes* em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):169-173.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1982. Intoxicação de bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. *Pesq. Vet. Bras.* 2(4):143-147.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. Editora Helianthus, Rio de Janeiro.
- Traverso S.D., Corrêa A.M.R., Schmitz M., Colodel E.M. & Driemeier D. 2004. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 24(4):211-216.
- Varaschin M.S., Wouters F., Petta I., Bezerra Júnior P.S. & Wouters A.T.B. 2011. Natural and experimental poisoning of bovines by *Cestrum corymbosum* Schlecht in the State of Minas Gerais, Brazil, p.227-230. In: Riet-Correa F., Pfister J., Schild A.L. & Wierenga T.L. (Eds), Poisoning by Plants, Mycotoxins, and related Toxins. CABI, Wallingford, Oxfordshire. 739p.

ARTIGO 2.

Neste item é apresentado o artigo **“Caracterização morfológica das alterações encefálicas relacionadas a hepatopatia tóxica aguda em bovinos”**, que será submetido a Revista Veterinary Pathology.

Caracterização morfológica das alterações encefálicas associadas a hepatopatia tóxica aguda em bovinos

A.T.B. Wouters¹, F. Wouters², F.M. Boabaid¹, G. Fredo¹, T.T.N. Watanabe¹, M.S. Varaschin², C.E.F. Cruz¹, D. Driemeier¹

Resumo

Hepatopatia tóxica aguda, decorrente de ingestão de plantas tóxicas ou larvas do inseto *Perreyia flavipes*, é causa frequente de morte em bovinos no Brasil e, muitas vezes, é acompanhada de encefalopatia hepática. Para a caracterização das alterações encefálicas foram avaliados cortes de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo de 22 bovinos intoxicados natural ou experimentalmente por cinco espécies de planta de ação hepatotóxica aguda ou pela ingestão de *P. flavipes*, pelas técnicas de hematoxilina e eosina e pelas provas de imuno-histoquímica (IHQ) usando os anticorpos anti-proteína S100 (anti-S100), anti-proteína glial fibrilar ácida (anti-GFAP) e anti-vimentina. Alterações astrocíticas, caracterizadas por núcleos tumefeitos e vesiculares (astrócitos Alzheimer tipo II) e/ou citoplasma volumoso fracamente eosinofílico e núcleo picnótico foram encontradas em todos os casos e evidenciadas pela IHQ, com intensa marcação citoplasmática no uso dos anticorpos anti-S100 e anti-GFAP. O presente estudo apresenta os astrócitos como alvo de lesão na hepatopatia tóxica aguda em bovinos.

Palavras-chave

encefalopatia hepática, hepatopatia aguda, neuropatologia, astrócitos, imuno-histoquímica

Abstract

Acute toxic liver disease is a common cause of cattle death in Brazil. It is often induced by ingestion of hepatotoxic plants or the larvae of *Perreyia flavipes*, and it is usually accompanied by hepatic encephalopathy. To characterize the brain changes, were examined cerebrum, brainstem and cerebellum of 22 natural or experimentally poisoned cattle, which ingested one of five species of acute hepatotoxic plant or *P. flavipes* larvae. Samples were evaluated by hematoxylin and eosin and by anti-S100, anti-glial fibrillary acidic protein and anti-vimentin immunostaining. Astrocytic changes,

¹ Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil.

² Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil

Corresponding Author:

David Driemeier, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia 91540-000, Porto Alegre-RS, Brazil. Email: davetpat@ufrgs.br

characterized by swollen and vesicular nuclei (Alzheimer type II astrocytes) and / or large and poorly eosinophilic cytoplasm in addition to picnotic nuclei were found in all cases and evidenced by IHC, with strong cytoplasmic staining on using anti-S100 and anti-GFAP immunohistochemistry. This study shows astrocytes as a target for acute toxic liver injury in cattle.

Keywords

hepatic encephalopathy, neuropathology, acute hepatopathy, astrocytes, immunohistochemistry

Na intoxicação por diferentes espécies de plantas de ação hepatotóxica aguda em bovinos no Brasil têm sido observadas manifestações clínicas neurológicas, caracterizadas principalmente por agressividade, tremores musculares, pressão da cabeça contra obstáculos, incoordenação, decúbito esternal e lateral com movimentos de pedalagem e alterações (Driemeier et al. 1999, Cattani et al. 2004, Traverso et al. 2004, Riet-Correa et al. 2009, Varaschin et al. 2011, Tokarnia et al. 2012). Em alguns casos são descritas também alterações encefálicas macroscópicas (Traverso et al. 2004, Varaschin et al. 2011) e histológicas (Méndez, Santos & Riet-Correa 1998, Traverso et al. 2004), cuja patogenia não estava ainda definida. Além das plantas, deve se considerar a intoxicação pelo inseto *Perreya flavipes*, descrita em bovinos e ovinos no Sul do Brasil, com ingestão de suas larvas em pastagens, principalmente no período de outono e inverno (Soares, Quevedo & Schild 2008, Raymundo et al. 2009, Tessele et al. 2012).

Na encefalopatia hepática (EH) decorrente de lesões hepáticas crônicas em bovinos no Brasil, relacionada especialmente à ingestão de *Senecio* spp. (Méndez et al. 1987, Barros et al. 1992, Tokarnia et al. 2012), é descrita alteração/degeneração esponjosa (“*status spongiosus*”), caracterizada por microcavitações, mais evidentes em tratos mielinizados da substância branca encefálica e na junção entre substância branca e cinzenta do córtex telencefálico. O “*status spongiosus*” é atribuído a edema intramielínico, causando separação e vacuolização de bainhas de mielina (Summers et al. 1995, Barros 2010). Além do “*status spongiosus*” são descritos astrócitos com núcleo volumoso e vesicular na substância cinzenta, isolados ou em grupamentos de duas, três ou quatro células, denominados astrócitos Alzheimer tipo II (AAII) (Summers et al. 1995, Zachary 2012). O achado de uma e/ou outra alteração depende da espécie

animal afetada. Em equinos a EH se caracteriza pelo achado de AAI (Bandarra et al. 2010), enquanto que, em outras espécies, incluindo bovinos, ambas as alterações podem ocorrer mas, frequentemente, “*status spongiosus*” é a alteração mais encontrada, ou mesmo a única descrita (Summers et al. 1995).

A hiperamonemia é considerada como o principal fator na patogênese da EH. A amônia, que deriva da degradação bacteriana de amina, aminoácidos, purinas e ureia no trato gastrointestinal, em animais saudáveis é biotransformada em ureia pelo ciclo da ornitina-citrulina-arginina-ureia no fígado. Em casos de hepatopatia difusa há prejuízo na biotransformação hepática da amônia, com hiperamonemia resultante (Córdoba & Mínguez 2008, Zachary 2012).

Na EH associada à hepatopatia tóxica aguda em humanos tem sido relacionado o envolvimento de astrócitos (Kato et al. 1992, Vaquero et al. 2003, Frosch, Anthony & Girolami 2010). Estas células gliais estão entre as primeiras células lesadas em agressões ao sistema nervoso central (SNC), o que tem relação com seu importante papel no equilíbrio de fluidos e eletrólitos no SNC (Summers et al. 1995, Rao et al. 2005, Sofroniew & Vinters 2010). A remoção de amônia do encéfalo depende da síntese de glutamina pelos astrócitos, cuja enzima responsável é a glutamina-sintetase (Butterworth 1997, Häussinger & Schliess 2008). Este trabalho descreve as alterações histológicas encefálicas em casos de intoxicação natural e/ou experimental por *Cestrum corymbosum*, *C. intermedium*, *Dodonaea viscosa*, *Perreyia flavipes*, *Trema micrantha* e *Xanthium cavanillesii* (subespécie de *Xanthium strumarium*) em bovinos e sua caracterização imuno-histoquímica com os anticorpos anti-GFAP, anti-S100 e anti-vimentina.

Material e Métodos

Foram utilizados os espécimes emblocados em parafina de bovinos com hepatopatia tóxica aguda dos arquivos do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) do período de 1998 a 2012 dos casos em que havia amostras de telencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e fígado, realizados cortes de 3µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina (HE) e avaliados na histologia. Dados referentes a manifestações clínicas, achados de necropsia e achados histológicos foram também avaliados.

Cortes histológicos (3µm) desparafinados das mesmas áreas selecionadas do SNC foram submetidos à técnica de IHQ, pelo método estreptavidina-biotina ligada à

peroxidase para os anticorpos anti-GFAP e anti-S100 e pelo método da estreptavidina-biotina ligada à fosfatase para o anticorpo anti-vimentina (Tabela 1).

Cortes de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo de 11 bovinos adultos da rotina de diagnóstico, com causas de morte diversas, mas sem manifestações clínicas e/ou lesões relacionadas a alterações hepáticas, nem encefálicas, foram avaliados pelas mesmas técnicas para controle negativo.

Resultados

Amostras de tecidos de vinte e dois bovinos intoxicados por *C. intermedium* (2/22), *P. flavipes* (3/22), *C. corymbosum* (5/22), *D. viscosa* (3/22), *T. micrantha* (6/22) e *X. cavanillesii* (3/22) foram usadas. Dados sobre dose tóxica e períodos pré-clínicos e clínicos são apresentados na Tabela 2.

Para todos os bovinos do estudo houve registro de manifestações clínicas de envolvimento encefálico (Tabela 3), exceto em quatro animais, por não terem sido submetidos a avaliação clínica.

Alterações encefálicas macroscópicas foram observadas em 3/22 bovinos e foram caracterizadas por achatamento das circunvoluções, com arrasamento dos sulcos e conificação cerebelar em um caso; extensa área de hemorragia no lobo parietal esquerdo em outro e múltiplas petéquias no cerebelo no terceiro. Alterações hepáticas estavam presentes na necropsia de todos os bovinos e eram caracterizadas por evidenciação do padrão lobular. Alterações macroscópicas relacionadas à insuficiência hepática, além das relacionadas à EH, foram também observadas e incluíam hemorragias disseminadas (15 animais), icterícia discreta (2 bovinos) ou moderada (1 bovino) e ascite (5 bovinos). Achados histológicos no fígado são apresentados na Fig. 1.

Na avaliação histológica das áreas selecionadas do SNC, os achados mais importantes foram alterações astrocíticas, apresentadas na Tabela 4. Astrócitos Alzheimer tipo II foram observados mais acentuada e frequentemente nos animais intoxicados por *T. micrantha* e por *P. flavipes*, na substância cinzenta do córtex telencefálico (Fig. 2), do tronco encefálico e do cerebelo; neste estavam afetados especialmente os astrócitos de Bergmann. A maioria desses animais apresentou também algum grau de tumefação nuclear em astrócitos da substância branca.

Nos casos de intoxicação por *D. viscosa*, *C. corymbosum*, *C. intermedium* e *X. cavanillesii*, as alterações astrocíticas foram predominantes na substância branca. Caracterizavam-se por citoplasma volumoso e eosinofílico, além de núcleo denso e

retraído (Fig. 3). Astrócitos com alterações semelhantes foram também observados na substância cinzenta dos mesmos animais, especialmente no cerebelo, em astrócitos de Bergmann. Em 10 dos 22 bovinos havia também vacuolização da substância branca nessas áreas. No telencéfalo essas alterações foram mais evidentes na região subcortical e, no cerebelo, na substância branca dos fólhos mas, sobretudo, nos pedúnculos cerebelares.

Alterações circulatórias foram observadas no encéfalo, caracterizadas por congestão moderada a acentuada em telencéfalo (5 bovinos), tronco encefálico (8 bovinos) e cerebelo (6 bovinos). Havia hemorragias submeningeanas e multifocais na substância cinzenta do cerebelo (1 bovinos); hemorragias multifocais no tronco encefálico (2 bovinos) e no telencéfalo (1 bovinos). Edema perivascular foi observado na substância cinzenta telencefálica (16/22 bovinos) no tronco encefálico (1 bovino) e no cerebelo (2 bovinos) e edema perineuronal foi observado em córtex telencefálico de seis animais (6 bovinos).

Nas técnicas de IHQ empregadas, com uso do anticorpo anti-GFAP houve ausência de imunomarcagem no corpo celular dos AAI, mas havia marcação nos seus processos celulares, com aumento de espessura em relação a animais controle. Na substância branca houve forte marcação em processos astrocíticos, evidenciando aumento de espessura e densidade dos mesmos, além de marcação nítida de seus pés terminais em substância cinzenta e branca. Astrócitos de citoplasma volumoso e núcleos densos e retraídos apresentaram forte marcação do citoplasma (Fig. 4), tanto em substância cinzenta, quanto branca.

A aplicação do anticorpo anti-S100 resultou em imunomarcagem evidente do núcleo e do citoplasma de astrócitos em substância cinzenta e branca de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo. Houve evidência dos AAI (Fig. 5), bem como dos astrócitos com citoplasma volumoso e núcleo retraído na substância branca. Em muitos vacúolos formados na substância branca havia marcação positiva periférica, delimitando-os (Fig. 6). Na IHQ anti-vimentina houve forte imunomarcagem em paredes vasculares, no entanto, não houve diferença significativa em relação aos cortes de encéfalo dos bovinos controle.

Discussão e Conclusões

Em todos os animais do estudo submetidos a avaliação clínica foram observadas manifestações neurológicas e, em todos os casos, havia lesões histológicas no encéfalo,

caracterizadas por alterações astrocíticas. Astrócitos de Alzheimer tipo II foram observados no encéfalo dos casos de intoxicação por *T. micrantha* e por *P. flavipes*.

No entanto, astrócitos com citoplasma volumoso e núcleo denso e retraído, como observados na substância branca do encéfalo de 14 dos 22 bovinos, foi relatado apenas recentemente em bovinos com hepatopatia tóxica aguda por *Cestrum intermedium* (Wouters et al. 2013). Essas alterações constituíram um achado importante no encéfalo de todos os casos de intoxicação por *Cestrum corymbosum* e por *X. cavanillesii*, nos quais o período de tempo médio desde o término da ingestão do agente hepatotóxico até o óbito foi de 35 h. Constituiu também o achado histológico mais consistente em um caso de intoxicação por *D. viscosa* e em caso de *T. micrantha*, nos quais esse período foi inferior a 72 h, indicando ser o período de tempo entre ingestão da planta e a morte o fator mais importante para esta apresentação morfológica dos astrócitos na hepatopatia tóxica aguda. No relato de intoxicação de bovinos por *C. intermedium* (Wouters et al. 2013) a morte ocorre em menos de 24 h após início dos sinais clínicos. É descrito que, imediatamente, após agressão os astrócitos passam a sintetizar quantidades aumentadas de GFAP em seu citoplasma e, sob agressão, respondem com alteração morfológica, caracterizada por volume aumentado e citoplasma mais distinto, processos celulares mais espessos e evidentes. Em 36-48 h após o insulto já pode ser observada alteração na imunomarcagem anti-GFAP, com pico em torno de 72 h e intensidade decrescente em semanas a meses (Switzer & Butt 2011). Em culturas de astrócitos de rato expostas a amônia foi observado aumento progressivo no volume celular em um a três dias após exposição (Jayakumar et al. 2006).

Por outro lado, nos casos de intoxicação por *T. micrantha* e por *P. flavipes* houve predomínio de alterações nucleares nos astrócitos, com astrócitos Alzheimer tipo II e tumefação nuclear de astrócitos da substância branca. Na intoxicação por *T. micrantha* o tempo da ingestão da planta até a morte durou em média 133 h. Nos casos de intoxicação espontânea por *P. flavipes* não houve observação da evolução clínica, no entanto, em um trabalho de intoxicação experimental por essas larvas em ovinos (Raymundo et al. 2012), a evolução até a morte foi de 102 h, em média.

A alteração de núcleo denso e retraído nos astrócitos com citoplasma volumoso foi interpretada como picnose, um aspecto morfológico da necrose. A vacuolização observada nas mesmas áreas da substância branca do encéfalo em que havia astrócitos com citoplasma volumoso e núcleo picnótico foi atribuída a tumefação, morte e desintegração de astrócitos, evidenciadas pela forte imunomarcagem na periferia desses

vacúolos usando imunomarcção anti-S100. Os vacúolos eram arredondados e definidos, diferentes daqueles descritos nos casos de EH associada a hepatopatia crônica (Summers et al. 1995, Barros 2010). Devem ser consideradas as situações em que astrócitos foram destruídos, com provável redução quantitativa na imunomarcção (Switzer & Butt, 2011).

Alterações astrocíticas degenerativonecróticas foram os achados mais relevantes no estudo das lesões encefálicas de bovinos intoxicados por seis agentes de efeito hepatotóxico e que apresentaram lesão hepática aguda difusa acentuada (exceto um caso, em que era moderada). Esses achados apontam para a participação da hiperamonemia na patogenia das lesões, uma vez que a remoção de amônia do encéfalo depende da síntese de glutamina pelos astrócitos e o acúmulo de glutamina em astrócitos exacerba as forças osmóticas que induzem tumefação astrocitária. Estudos *in vitro* apresentam aumento significativo do conteúdo celular de glutamina em apenas 1 a 4 h após exposição à amônia e, no período em que era observada tumefação astrocitária, os níveis de glutamina já haviam normalizado. Isso indica não ser a presença da glutamina, mas algum processo resultante do metabolismo da mesma, o responsável pela tumefação astrocitária (Jayakumar et al. 2006).

Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, relacionados à metabolização da glutamina, são considerados na indução das alterações astrocíticas (Rama Rao et al. 2012). A glutamina formada é transportada às mitocôndrias dos astrócitos, hidrolisada pela glutaminase, proporcionando níveis elevados de amônia nas mitocôndrias o que, por sua vez, leva ao acúmulo de espécies de oxigênio e nitrogênio altamente reativos (ROS/RNS) e à transição de permeabilidade mitocondrial (mPT), considerados os responsáveis finais pela disfunção astrocitária. O aumento na produção de ROS/RNS desencadeia modificações múltiplas em proteínas e RNA (Häussinger & Schliess 2008). Jayakumar et al. (2006) já haviam verificado que a amônia e a glutamina induzem mPT em cultura de astrócitos. A mPT é caracterizada por alteração da permeabilidade da membrana interna das mitocôndrias, resultando na sua tumefação e, conseqüentemente, em disfunção mitocondrial. Dessa forma, as mitocôndrias representam o loco em que a amônia e a glutamina exercem seus efeitos patogênicos na EH (Rama Rao et al. 2012).

Hiponatremia tem sido descrita em pacientes humanos com insuficiência hepática aguda, hiperamonemia e edema cerebral, sendo sugerido um distúrbio osmolar-hemodinâmico combinado, com participação da produção de glutamina no processo de

tumefação astrocitária e potencialização do edema associada à baixa concentração sérica de sódio (Blei 2001, Häussinger & Schliess 2008).

Também em humanos é descrita resposta astrocítica com tumefação citoplasmática em casos hipoglicemia (Frosch, Anthony & Girolami 2010) e esta tem sido considerada na patogenia dos distúrbios neurológicos em animais com hepatopatia difusa aguda (Driemeier et al. 1999, Colodel et al. 2000, Traverso et al. 2004, Barros 2010), no entanto, hipoglicemia não pôde ser associada com a encefalopatia por hepatopatia tóxica aguda nesses casos, pois em apenas quatro dos 22 bovinos do estudo havia sido feita a dosagem de glicose sérica, com verificação de hipoglicemia em três deles, número insuficiente para a comparação das alterações histológicas.

A imunomarcção anti-vimentina foi empregada no presente trabalho para avaliar paredes vasculares e astrócitos, uma vez que astrócitos jovens e/ou que sofreram agressão podem sintetizar vimentina (Orsini et al. 2007). Houve forte imunomarcção de paredes vasculares em todos os cortes encefálicos de animais intoxicados e controle; a ausência de marcação em astrócitos indica que não houve síntese de vimentina nos astrócitos nesses casos.

As alterações degenerativonecróticas identificadas nos astrócitos dos bovinos evidenciam que os astrócitos constituem importante alvo de lesão nos casos de EH por hepatopatia tóxica aguda. A técnica de IHQ, com imunomarcção anti-GFAP e anti-S100 foram ferramentas importantes para a avaliação dessas alterações astrocíticas. Além disso, sua constatação, aliada à falta de alterações em estruturas vasculares encefálicas, avaliadas com auxílio da técnica de IHQ anti-vimentina permitem afirmar a origem citotóxica do edema encefálico nos casos de EH relacionada à hepatopatia tóxica aguda.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declararam não haver conflitos de interesse em relação à pesquisa, autoria e / ou publicação deste artigo.

Financiamento

Este trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Referências

1. Bandarra PM, Pavarini SP, Raymundo DL, et al. *Trema micrantha* toxicity in horses in Brazil. *Eq Vet J.* 2010; **42**:456–459.
2. Barros CSL, Driemeier D, Pilati C, et al. *Senecio* spp. poisoning in cattle in southern Brazil. *Vet Human Toxicol.* 1992; **34**:241–246.
3. Barros CSL. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. In: Santos RL, Alessi AC. *Patologia Veterinária.* 1th ed. São Paulo, SP: Roca; 2010. 269-285.
4. Blei AT. Pathophysiology of brain edema in fulminant hepatic failure, revisited. *Metab Brain Dis.* 2001; **16**:85–94.
5. Butterworth RF. Hepatic encephalopathy and brain edema in acute hepatic failure: Does glutamate play a role? *Hepatology.* 1997; **25**:1032–1034.
6. Cattani CSO, Colodel EM, Traverso SD, et al. Intoxicação experimental por *Dodonaea viscosa* em bovinos. *Pesq Vet Bras.* 2004; **24**:31–34.
7. Colodel EM, Driemeier D, Pilati C. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* em bovinos. *Pesq Vet Bras.* 2000; **20**:31–38.
8. Cordoba J, Mínguez B. Hepatic Encephalopathy: Pathogenesis. *Semin Liver Dis.* 2008; **28**:70–80.
9. Driemeier D, Irigoyen LF, Loretto AP, et al. Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 1999; **19**:12–18.
10. Frosch MP, Anthony DC, Girolami U. The central nervous system. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease.* 8th ed. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 2010. 1328-1329.
11. Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut.* 2008; **57**:1156–1165.
12. Jayakumar AR, Rama Rao KV, Murthy CRK, et al. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int.* 2006; **48**:623–628.
13. Kato M, Hughes RD, Keays RT, et al. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 1992; **15**:1060–1066.
14. Méndez MC, Riet-Correa F, Schild AL. Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 1987; **7**:51–56.
15. Méndez MC, Santos RC, Riet-Correa F. Intoxication by *Xanthium cavanillesii* in cattle and sheep in southern Brazil. *Vet Hum Toxicol.* 1998; **40**:144–147.

16. Orsini H, Bondan EF, Sanchez M, et al. Marcação imunistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; **65**: 1070–1077.
17. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg M.D. Glutamine in the pathogenesis of acute hepatic encephalopathy. *Neurochem Int.* 2012; **61**:575–580.
18. Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR. Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res.* 2005; **30**:1311–1318.
19. Raymundo DL, Bezerra Júnior PS, Bandarra PM, et al. Intoxicação espontânea pelas larvas de *Perreyia flavipes* em bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Cienc Rural.* 2009; **39**:163–166.
20. Raymundo DL, Bezerra Júnior PS, Bandarra PM, et al. *Perreyia flavipes* larvae toxicity. *Pesq Vet Bras.* 2012; **32**:735–738.
21. Riet-Correa F, Medeiros RMT, Pfister J, et al. *Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock.* Campina Grande, PB: UFCG; 2009. 53-65.
22. Soares MP, Quevedo PS, Schild AL. Intoxicação por larvas de *Perreyia flavipes* Konow, 1899 (Hymenoptera: Pergidae) em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2008; **28**:169–173.
23. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; **119**:7–35.
24. Summers BA, Cummings JF, De Lahunta A. *Veterinary Neuropathology.* St. Louis, USA: Mosby, 1995. 208-211.
25. Switzer RC, Butt MT. histological markers of neuroxicity (non fluorescent). In: Bolon B, Butt MT. *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists. Principles and Techniques.* Hoboken, USA: John Wiley & Sons; 2011. 181-190.
26. Tessele B, Brum JS, Schild AL, et al. Sawfly larval poisoning in cattle: Report on new outbreaks and brief review of the literature. *Pesq Vet Bras.* 2012; **32**:1095–1102.
27. Tokarnia CH, Döbereiner J, Barbosa JD, et al. *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção.* 2th ed. Rio de Janeiro, RJ: Helianthus; 2012. 148-202.
28. Traverso SD, Corrêa AMR, Schmitz M, et al. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. *Pesq Vet Bras.* 2004; **24**:211–216.
29. Vaquero J, Chung C, Blei AT. Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Annals Hepatology.* 2003; **2**:12–22.
30. Varaschin MS, Wouters F, Petta I, et al. Natural and experimental poisoning of bovines by *Cestrum corymbosum* Schlecht in the State of Minas Gerais, Brazil. In:

- Riet-Correa F, Pfister J, Schild, AL, et al. *Poisoning by Plants, Mycotoxins and related toxins*. 2011. 227–230.
31. Wouters ATB, Boabaid FM, Watanabe TTN, et al. Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesq Vet Bras* 2013; **33**:47-51.
 32. Zachary JF. Nervous System. In: Zachary JF, McGavin MD. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. St. Louis, USA: Elsevier Mosby. 2012. 813-821.

Tabelas

Tabela 1. Recuperações antigênicas, diluições e origem dos anticorpos primários utilizados na técnica de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Especificações anticorpo	Recuperação antigênica	Diluição anticorpo	Laboratório
Anti-GFAP	Policlonal coelho	TRIS-EDTA pH 9.0, 96° C, 40 min	1:500	Dako
Anti-S100	Policlonal coelho	Citrato pH 6.0, 96° C, 40 min	1:200	Dako
Anti-Vimentina	Clone V9 camundongo	Citrato pH 6.0, 125° C, 3 min	1:200	Zymed

* Obtido em panela de pressão

Tabela 2. Dados sobre a forma de intoxicação, doses períodos clínicos e em bovinos intoxicados por agentes hepatotóxicos de ação aguda.

Agente hepatotóxico	Intoxicação	Bovino	Dose g/kg	Início sinais clínicos*	Evolução clínica em horas
<i>Cestrum corymbosum</i>	Experimental	1	17,5	12	7
		2	7,5	20	56
		3	5	6	18
		4	15	21	70
		5	30	18	8
<i>Cestrum intermedium</i>	Espontânea	1	-	-	-
		2	-	-	-
<i>Dodonaea viscosa</i>	Experimental	1	30	45	3
		2	25	36	19
		3	30	36	36
<i>Perreyia flavipes</i>	Espontânea	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
<i>Trema micrantha</i>	Experimental	1	54	16	137
		2	79	24	99
		3	106	38	100
		4	57	20	47
		5	60	41	106
		6	60	67	37
<i>Xanthium cavanillesii</i>	Experimental	1	10	7	8
		2	5	12	7
		3	5	7	6

* valores em horas; após término da administração da planta.

Tabela 3. Manifestações clínicas neurológicas apresentadas pelos bovinos intoxicados por agentes hepatotóxicos agudos.

Manifestação clínica	<i>C</i> <i>corym.</i> (5)*	<i>Cestrum</i> <i>interm.</i> (1)	<i>Dodonaea</i> (3)	<i>Trema</i> (6)	<i>Xanthium</i> (3)	TOTAL** (%)
Tremores musculares	5	1	3	6	3	18 (100)
Movimentos pedragem	5	1	2	6	3	17 (94,4)
Dificuldade/relutância andar	5	0	3	0	3	11 (61,1)
Ataxia	5	1	1	0	3	10 (55,5)
Pressão da cabeça	0	0	3	2	0	5 (27,7)
Agressividade	0	1	2	1	0	4 (22,2)
Apatia	0	0	1	0	3	4 (22,2)
Dificuldade de estação	0	0	3	1	0	4 (22,2)
Andar em círculos	1	0	0	2	0	3 (16,6)
Arrastamento pinças	0	0	0	0	3	3 (16,6)
Convulsões	0	0	0	0	3	3 (16,6)
Opistótono	0	0	0	0	3	3 (16,6)
Movimentos cervicais	0	0	0	2	0	2 (11,1)
Apoio cabeça no solo	0	0	0	1	0	1 (5,5)
Hiperestesia	1	0	0	0	0	1 (5,5)
Hipermetria	0	0	0	1	0	1 (5,5)
Posições anômalas	0	0	0	1	0	1 (5,5)
Quedas	0	0	0	1	0	1 (5,5)
Retenção oral de alimento	0	0	0	1	0	1 (5,5)

* Total de animais na categoria; ** Excluídos os casos de intoxicação espontânea por *P. flavipes* (3) e por *C. intermedium* (1) nos quais não houve observação clínica; *corym.*= *Cestrum corymbosum*; *interm.*= *Cestrum intermedium*

Tabela 4. Achados histológicos no encéfalo de bovinos intoxicados por agentes hepatotóxicos agudos.

Agente hepatotóxico	Bovino	Astrócitos Alzheimer			Astrócitos com núcleo tumefeito*			Astrócitos citoplasma volumoso			Vacuol. substância branca		
		II			tele	tron	cer	tele	tron	cer	tele	tron	cer
		tele	tron	cer	tele	tron	cer	tele	tron	cer	tele	tron	cer
<i>Cestrum corymbosum</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
	5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>Cestrum intermedium</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Dodonaea viscosa</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Perreyia flavipes</i>	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trema micrantha</i>	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthium cavanillesii</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

* na substância branca; Vacuol.= vacuolização; tele= telencéfalo; tron= tronco encefálico; cer= cerebelo; + presente; - ausente

Legenda das figuras

Figura 1. Necrose coagulativa difusa acentuada de hepatócitos associada a hemorragia em bovino intoxicado por *Trema micrantha*. Há vacuolização do citoplasma de hepatócitos na periferia dos lóbulos e discreta proliferação de epitélio biliar; asterisco identifica veia centrolobular. HE, obj. 20.

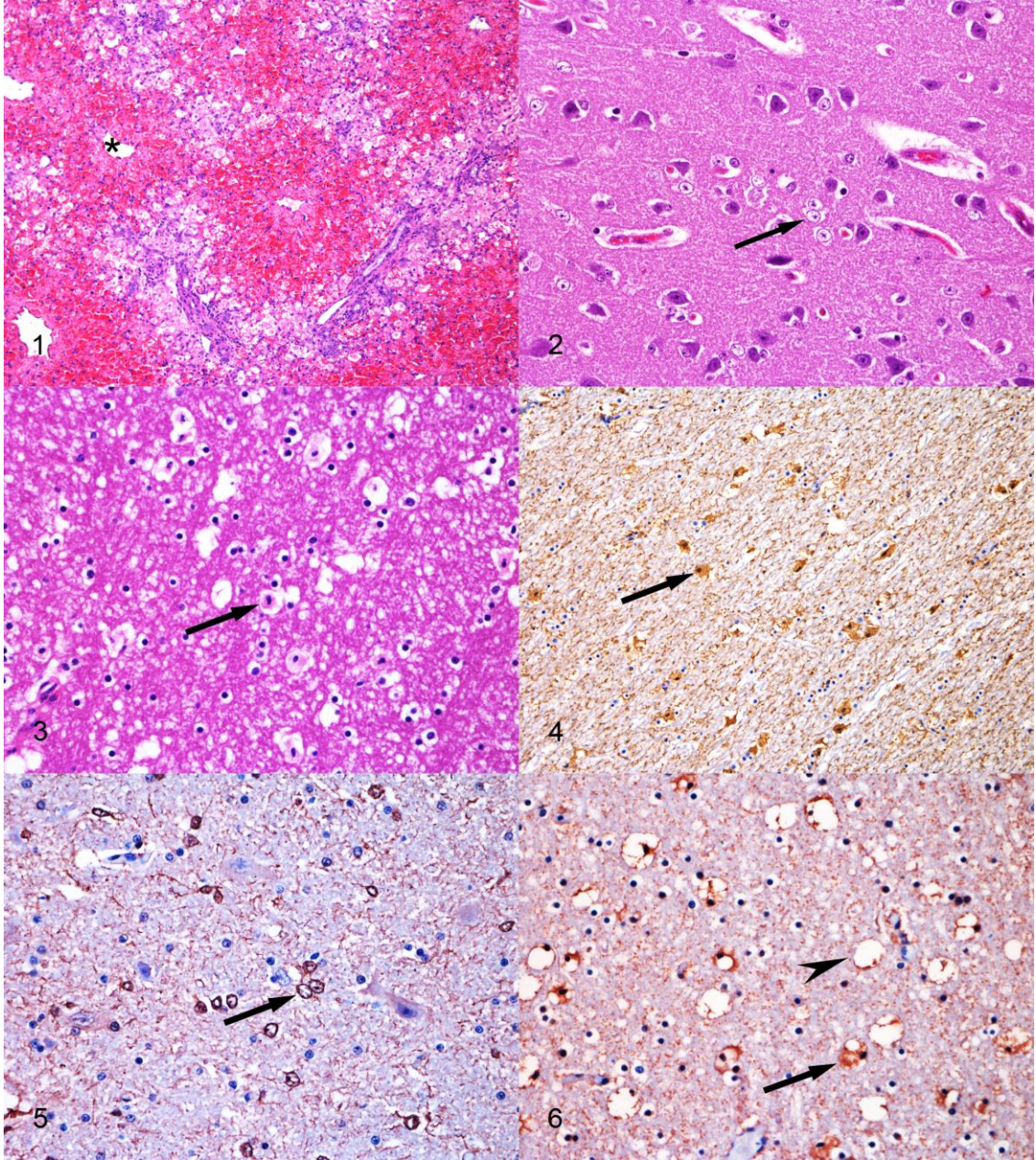
Figura 2. Astrócitos Alzheimer tipo II (seta) em córtex telencefálico de bovino intoxicado por *T. micrantha* HE, obj.40.

Figura 3. Astrócitos com citoplasma volumoso e eosinofílico e núcleo picnótico (seta) na substância branca do cerebelo de bovino intoxicado por *X. cavanillesii*. HE, obj.40.

Figura 4. Evidenciação de astrócitos com citoplasma volumoso e núcleo picnótico na imunomarcação anti-GFAP (seta) em bovino intoxicado por *X. cavanillesii*. Método estreptavidina-peroxidase, cromógeno DAB, obj.20.

Figura 5. Astrócitos Alzheimer tipo II (seta) com imunomarcação anti-S100 em córtex telencefálico de bovino intoxicado por *T. micrantha*. Método estreptavidina-peroxidase, cromógeno VECTOR NovaRed, obj.40.

Figura 6. Astrócitos com citoplasma volumoso (seta) e vacuolização da substância branca em cerebelo de bovino intoxicado por *X. cavanillesii*. Observa-se delimitação periférica dos vacúolos na imunomarcação anti-S100 (cabeça de seta). Método estreptavidina-peroxidase, cromógeno VECTOR NovaRed, obj.40.



ARTIGO 3.

Neste item é apresentado o artigo “**Caracterização imuno-histoquímica das alterações encefálicas em bovinos com hepatopatia tóxica por *Senecio sp.***”, que será submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Trabalho...

Caracterização imuno-histoquímica das alterações encefálicas em bovinos com hepatopatia tóxica por *Senecio* sp.

Angelica T.B. Wouters², Fabiana M. Boabaid², Gabriela Fredo², Flademir Wouters² e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Wouters A.T.B., Boabaid F.M., Fredo, G., Wouters F., & Driemeier D. 2013. [Immunohistochemical characterization of bovine brain lesions caused by *Senecio* sp. ingestion.] Caracterização imuno-histoquímica das alterações encefálicas em bovinos com hepatopatia causada por ingestão de *Senecio* sp. *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

Senecio spp. poisoning is an important cause of illness and death of cattle in Rio Grande do Sul, Brazil, and is often manifested by neurologic clinical signs and histological brain changes. Histological evaluation was performed on liver and brain samples of ten cattle naturally poisoned by *Senecio* sp. Samples of cerebrum, brainstem and cerebellum were stained with periodic acid-Schiff (PAS) and immunohistochemistry were carried out, employing anti-fibrillary acidic protein (GFAP), anti-S100 protein and anti-vimentin antibodies. The histological finding included mild to severe vacuolation in the white matter and the junction of gray and white matter, characterized as spongy degeneration. Histochemical staining and immunohistochemistry technique revealed no significant findings compared with the brains of eleven adult cattle without liver and / or brain changes used as controls.

INDEX TERMS: plant poisoning, hepatic encephalopathy, status spongiosus, GFAP, S100, vimentin

RESUMO.- Intoxicação por *Senecio* spp. é causa importante de doença e morte em bovinos no Rio Grande do Sul e frequentemente cursa com manifestações clínicas neurológicas e alterações histológicas encefálicas. Foi realizada avaliação histológica em fígado e encéfalo de dez bovinos naturalmente intoxicados por *Senecio* sp. e realizadas as técnicas de histoquímica de ácido periódico de Schiff e de imuno-histoquímica, com emprego dos anticorpos anti-proteína fibrilar ácida (GFAP), anti-proteína S100 e anti-vimentina em amostras de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo. Na histologia observou-se vacuolização discreta a acentuada em substância branca e/ou junção entre substância branca e cinzenta, caracterizada como degeneração esponjosa. Na avaliação histoquímica e imuno-histoquímica não houve diferenças significativas em relação aos achados em encéfalo de onze bovinos controle, adultos, sem alterações hepáticas e/ou encefálicas, avaliados pelas mesmas técnicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: intoxicação por planta, encefalopatia hepática, degeneração esponjosa, GFAP, S100, vimentina.

INTRODUÇÃO

Senecio spp., importantes plantas tóxicas da Região Sul do Brasil, têm sido referidas como as principais dentre todas as causas de morte em bovinos nas regiões central (Rissi et al. 2007, Lucena et al. 2010) e sul (Karam et al. 2004, Schild et al. 2008) do Rio Grande do Sul e foram responsabilizadas por, aproximadamente, 50% das mortes de bovinos atribuídas à intoxicação por plantas no Rio Grande do Sul, no período de 1978 a 1998 (Riet-Correa et al. 2009). Além dos prejuízos na bovinocultura, há registros de mortalidade em equinos (Gava & Barros 1997), ovinos (Ilha et al. 2001) e búfalos (Corrêa et al. 2008) intoxicados pela planta.

Senecio sp. contém alcaloides pirrolizidínicos (AP), os quais estão entre as principais toxinas para bovinos em todo o mundo. Os AP ocorrem nas plantas sob duas formas; alcaloides propriamente ditos e alcaloides N-óxidos. Estes apresentam um átomo de oxigênio ligado ao anel da molécula; não são tóxicos e, quando absorvidos, são facilmente eliminados via urina. No entanto, a forma N-óxido pode ser biotransformada no intestino, contribuindo para a toxidez da planta. No fígado os AP são transformados em metabólitos pirrólicos, quimicamente muito reativos. Esses

metabólitos podem causar a morte dos hepatócitos ou impedir sua mitose, de forma que continuam a aumentar de volume, com resultante megalocitose e podem também causar dano vascular. Os AP induzem lesão hepática crônica, com fibrose acentuada (McKenzie 2012).

A toxidez das plantas que contém AP é variável. Os níveis de AP nas plantas podem alterar ano a ano, e têm relação com vários fatores, como época do ano, estágio de crescimento da planta, tipo de solo e sua fertilidade. Ocorrência de surtos de intoxicação após seca prolongada tem sido registrada (Driemeier et al. 1991, Grecco et al. 2011). *Senecio brasiliensis*, uma das causas mais frequentes da intoxicação por AP em bovinos no sul do Brasil, é também a espécie que apresenta as concentrações mais elevadas de AP (Karam et al 2004, Riet-Correa et al. 2009). *S. brasiliensis* e *S. oxyphyllus* são descritos como causa de surtos de intoxicação em bovinos (Barros et al. 1987, Barros et al. 1992) e equinos (Gava & Barros 1997) na Região Central do Rio Grande do Sul e *S. brasiliensis* é descrito como causa de intoxicação em búfalos (Correa et al. 2008). Outras espécies de senécio nativas do RS, incluindo *S. selloi*, *S. heterotrichius* e *S. leptolobus* são também descritas como causa de intoxicação em bovinos (Karam et al. 2004). Mais recentemente, outra espécie; *S. madagascariensis*, foi identificada como causa de morte em bovinos. A espécie não é nativa do Brasil mas tem se alastrado no sul do País e induz lesões hepáticas idênticas às causadas por *S. brasiliensis* (Cruz et al. 2010).

As plantas que contém quantidades significativas de AP, geralmente não são muito palatáveis e a ingestão ocorre em situações que a favorecem, como escassez de forragem e contaminação de feno ou silagem por plantas com AP (Barros et al. 2007, McKenzie 2012). A ingestão de *Senecio* spp. por bovinos na Região Sul do Brasil ocorre, principalmente, no inverno, período em que a planta se encontra em fase de brotação e contém maior concentração de AP, fatores que, muitas vezes, coincidem com escassez de forragem (Riet-Correa et al. 2009).

Outro fator importante é o efeito acumulativo dos AP. Assim, a ingestão pode ocorrer por meses a anos até que haja danos hepáticos, suficientemente graves para a manifestação de doença, geralmente, irreversível e fatal. Animais que não adoeceram num período de ingestão de AP podem adoecer e morrer, posteriormente, ao voltarem para pastagens infestadas. Em bovinos pode ocorrer doença e morte até 18 meses após a ingestão de AP em dose única (McKenzie 2012).

No sul do Brasil, casos clínicos da intoxicação são observados, principalmente, na primavera (Barros et al. 1987, Barros et al. 1992, Karam et al. 2004, Riet-Correa et al. 2009), mas casos e até surtos podem ocorrer também em outros períodos do ano, relacionados à manifestação tardia da doença (Karam et al. 2004, Riet-Correa et al. 2009), ou mesmo quando a ingestão do senécio está atrelada ao uso de forragem conservada e fornecida em cocho, na forma de feno, por exemplo (Barros et al. 2007). Bovinos de diferentes idades podem ser afetados, no entanto, a doença é mais comumente observada em animais adultos (Rissi et al. 2007, Riet-Correa et al. 2009), com mais de 3 anos de idade (Karam et al. 2004), porém Grecco et al. (2011) também observaram vários surtos de intoxicação (10/86) em bovinos mais jovens.

As manifestações clínicas mais frequentes são anorexia, apatia, pelos arrepiados, tenesmo, muitas vezes seguido por prolapso retal; afastamento do rebanho, perda de peso, ascite, distúrbios digestivos e neurológicos. Dois cursos clínicos podem ser identificados; um curso prolongado, caracterizado por perda de peso progressiva até a morte, que geralmente ocorre em várias semanas ou meses; ou um curso agudo ou subagudo, com morte em poucos dias (Barros et al. 1992).

Achados de necropsia incluem fígado reduzido de volume e bronzeado, com nódulos de 0,2 a 0,6cm de diâmetro, aleatoriamente distribuídos pelo parênquima hepático, além de vesícula biliar distendida, hidropericárdio, ascite e edema de mesentério (Cruz et al. 2010). Podem estar também presentes edema e hiperplasia adenomatosa da mucosa da vesícula biliar (Barros et al. 1992). Variações podem ser observadas nas alterações macroscópicas do fígado, que foram classificadas por Grecco et al. (2010) em seis padrões morfológicos, relacionados a diversidade em nodulações e coloração.

Encefalopatia hepática (EH) é relacionada a lesões hepáticas crônicas em bovinos, no Brasil devidas, especialmente, à ingestão de *Senecio* spp. (Méndez et al. 1987, Barros et al. 1992, Tokarnia et al. 2012), com descrição de alteração ou degeneração esponjosa, conhecida como "*status spongiosus*" no sistema nervoso central (SNC). Essa alteração é caracterizada por microcavitações no SNC, mais evidentes em tratos mielinizados da substância branca encefálica e na interface entre substância branca e cinzenta do córtex telencefálico (Barros 2010), bem como em cápsula interna, tálamo e colículos e, às vezes, na substância cinzenta (Riet-Correa et al. 2009).

Cho & Leipold (1977) induziram, por infusão intravenosa de acetato de amônio, vacuolização acentuada da substância branca no encéfalo de bezerros e menos intensa na substância cinzenta do encéfalo e da medula espinhal. Degeneração esponjosa é descrita relacionada a várias causas de

hepatopatia difusa em diferentes espécies animais por Hooper (1975), com formação de vacúolos, principalmente ao longo de determinados tratos axonais de substância branca e contíguos à substância cinzenta. A distribuição regular dos vacúolos nas mesmas áreas do SNC em um grande número de animais com EH é sugerida pelo mesmo autor como uma entidade específica relacionada à hiperamonemia.

O objetivo desse trabalho é descrever os achados histológicos em fígado e encéfalo de bovinos naturalmente intoxicados por *Senecio* sp. e sua caracterização imuno-histoquímica em telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo, usando os anticorpos anti-GFAP, anti-proteína S100 (anti-S100) e anti-vimentina.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez casos de bovinos com diagnóstico de intoxicação espontânea por *Senecio* sp., para os quais havia amostras de telencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e fígado emblocadas em parafina foram selecionados do arquivo do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFGRS). Foram realizados cortes de 3µm de espessura das amostras de fígado, telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo, corados por hematoxilina e eosina e avaliados na histologia. Dados disponíveis acerca do histórico, das manifestações clínicas e dos achados de necropsia foram recuperados. Foi realizada a técnica histoquímica de ácido periódico de Shiff (PAS) nas amostras de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo, em cortes de mesma espessura. Cortes das mesmas áreas selecionadas do SNC foram submetidos à técnica de IHQ, pelo método da estreptavidina-biotina ligada à peroxidase para os anticorpos anti-GFAP e anti-S100 e pelo método da estreptavidina-biotina ligada à fosfatase para o anticorpo anti-vimentina (Quadro 1).

Como controle negativo foram avaliadas as mesmas áreas do encéfalo de 11 bovinos da rotina de diagnóstico do SPV. Os casos selecionados para esse fim eram bovinos adultos, com diferentes causas de morte porém sem alterações clínicas e/ou lesões hepáticas nem encefálicas, com realização das técnicas de histoquímica de PAS e de IHQ, usando os mesmos anticorpos.

RESULTADOS

Todos os casos do estudo são de intoxicação espontânea por *Senecio* sp. Dados de histórico, achados clínicos e de necropsia são apresentados no Quadro 2.

Na avaliação histológica dos fígados foram observados fibrose, proliferação de ductos biliares, nódulos de regeneração, megalocitose e degeneração hepatocelular (Fig. 1) em todos os casos, com variações entre eles, principalmente em intensidade (Quadro 3).

Nas amostras de encéfalo verificaram-se, histologicamente, vacuolização discreta a acentuada no neurópilo em todos os casos, alterações astrocíticas e edema perivascular (Quadro 4). No telencéfalo havia vacuolização difusa no neurópilo na junção entre substância cinzenta e branca (Bovinos 1, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), focal na substância branca subcortical (Bovino 2) e em área mais profunda do córtex (Bovinos 5, 6 e 9). As alterações astrocíticas no telencéfalo foram discretas e caracterizadas por núcleo discretamente tumefeito (Bovinos 7 e 10) a vesicular (Bovinos 7 e 9), nas porções profundas do córtex telencefálico (Bovinos 9 e 10) e/ou na substância branca subcortical (Bovino 10). No tronco encefálico havia vacuolização predominantemente na substância cinzenta, com formação de vacúolos de formas e tamanhos irregulares (Fig. 2) atingindo as substâncias cinzenta e branca (Bovinos 7 e 10) ou a substância branca (Bovino 6). Alterações semelhantes às encontradas no telencéfalo foram observadas nos astrócitos do tronco encefálico em dois casos (Bovinos 7 e 10). No cerebelo havia vacuolização na substância branca, especialmente em pedúnculos cerebelares e fólhos (Bovinos 5, 6 e 10) com distribuição multifocal a coalescente (Bovino 6) ou difusa (Bovinos 5 e 10) e foi também observada tumefação nuclear em astrócitos da substância branca dos fólhos, bem como em astrócitos de Bergmann (Bovinos 6 e 8).

Na técnica histoquímica de PAS não havia alterações significativas nos cortes de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo dos casos estudados, bem como nos cortes de encéfalo dos bovinos controle.

Para as técnicas de IHQ empregadas, a aplicação do anticorpo anti-GFAP resultou na imunomarcção dos processos astrocíticos semelhante à marcação observada no encéfalo dos bovinos controle e houve evidência da tumefação de núcleos astrocíticos (Fig. 3 e 4). No emprego do anticorpo anti-S100 houve evidente imunomarcção do núcleo e do citoplasma de astrócitos em substância cinzenta e branca de telencéfalo, tronco encefálico e cerebelo, semelhante à marcação observada em animais controle. Na IHQ anti-vimentina houve forte imunomarcção em

paredes vasculares (Fig. 5), sem diferença em relação àquela observada em cortes de encéfalos de animais controle.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise histológica do fígado revelou fibrose, proliferação de ductos biliares e megalocitose, alterações consideradas características da intoxicação por AP (Barros et al. 1992, Driemeier & Barros 1992, Barros et al. 2007), com variações entre os casos, principalmente em intensidade. Grecco et al. (2010) também observaram variação em intensidade e distribuição das alterações e não observaram relação dessas variações com idade dos animais, tempo de evolução da intoxicação e sinais clínicos, no entanto, sugerem influência das condições climáticas no aumento da frequência da doença, por aumento da disponibilidade da planta para os animais.

Da região do tronco encefálico foram examinados óbex ou mesencéfalo, com disponibilidade de óbex em maior número de casos (6/10 bovinos), relacionada ao fato desses animais serem submetidos à investigação de lesões de encefalopatia espongiiforme bovina e o óbex constituir a região encefálica de eleição para confirmação diagnóstica dessa enfermidade, no entanto, as lesões foram mais acentuadas no mesencéfalo, avaliado em 4/10 casos, com vacuolização moderada e acentuada, achados semelhantes aos descritos por Mendez et al. (1987), Driemeier & Barros (1992), Sanches et al. (2000) e Santos et al. (2008) em bovinos e também por Ilha et al. (2001) em ovinos.

As técnicas de histoquímica de PAS e de IHQ anti-vimentina, empregadas para a avaliação de paredes vasculares e de material extravasado, apresentaram resultados similares aos encontrados em animais controle, indicando que a vacuolização encefálica não decorre de alterações vasculares nos casos de intoxicação crônica por *Senecio* sp. Hooper (1975) também não obteve achados relevantes na coloração de PAS em encéfalos de diferentes espécies animais com EH. Na pesquisa de Cho & Leipold (1977) nenhum material foi evidenciado nesses vacúolos em HE, nem em colorações especiais; não foi observada relação das cavitações com estruturas vasculares e também não havia alteração em espaços perivasculares.

Os exames histológico e de IHQ, com uso dos anticorpos anti-GFAP e anti-S100, revelaram alterações astrocíticas discretas em 5 dos 10 casos avaliados, apesar de haver, em todos eles, alterações hepáticas acentuadas, incluindo fibrose e proliferação de ductos biliares. Em casos de intoxicação de bovinos por *Cestrum intermedium*, planta de ação hepatotóxica aguda que cursa com sinais clínicos de EH, há achados histológicos encefálicos com alterações astrocíticas evidentes em cérebro e cerebelo, caracterizadas por tumefação celular com citoplasma amplo e eosinofílico, núcleo picnótico, ora excêntrico, mais evidentes em substância branca (Wouters et al. 2013). Esses dados sugerem que as alterações astrocíticas são precoces na EH e que, em casos de intoxicação por *Senecio* sp., que são caracterizados por evolução crônica - a maioria dos casos; ou subaguda (Driemeier & Barros, 1992), a patogenia das alterações encefálicas seja diferente. É descrito que astrócitos jovens ou que sofreram agressão podem sintetizar vimentina (Orsini et al. 2007). Nos encéfalos avaliados por IHQ usando anticorpo anti-vimentina não houve imunomarcagem em astrócitos.

A degeneração esponjosa tem sido atribuída a edema intramielínico (Sanches et al. 2000, Santos et al. 2008, Riet-Correa et al. 2009, Lucena et al. 2010), causando separação e vacuolização de bainhas de mielina (Summers et al. 1995, Barros 2010).

As bainhas de mielina, constituídas por arranjos concêntricos de processos oligodendrogliais compactados ao redor de axônios, são dispostas em segmentos espaçados pelos nodos de Ranvier. A região nodal, envolta por processos astrocíticos e oligodendrogliais e a compactação desses processos determinam a ocorrência de duas linhas distintas na bainha; a linha densa principal e a linha interperiódica (Graça et al. 2010). Estes autores relacionam a degeneração esponjosa a edema astrocitário e das bainhas de mielina, com separação das lamelas na linha interperiódica.

As alterações identificadas no exame histológico como degeneração esponjosa revelaram ser, em estudos de microscopia eletrônica descritos por Cho & Leipold (1977), grandes espaços vazios nas bainhas de mielina, dispostos entre as linhas densas das membranas de mielina e separação do espiral da mielina na lamela intraperiódica, com distensão de espaços extracelulares e tumefação mitocondrial e, quando de vacúolos múltiplos dentro de uma mesma lamela de mielina, correspondem a ruptura de membranas de mielina. Rissi et al. (2010) também mencionam uso da microscopia eletrônica para demonstração do edema intramielínico nos casos de degeneração esponjosa relacionados a insuficiência hepática crônica na intoxicação por AP.

Por outro lado, os estudos em microscopia eletrônica descritos por Cho & Leipold (1977) revelaram alterações escassas em astrócitos e seus processos, ausentes em células da glia, vasos sanguíneos e membranas basais. Neurônios, axônios e células da glia também apresentavam alterações escassas e havia pouca evidência de fragmentação da mielina.

Os métodos de histoquímica de PAS e de IHQ, com emprego dos anticorpos anti-GFAP, anti-S100 e anti-vimentina demonstraram, no presente estudo, não haver alterações significativas em estruturas vasculares e em astrócitos encefálicos nos casos de intoxicação de bovinos por *Senecio* sp., o que corrobora com a patogenia anteriormente proposta; a degeneração esponjosa, típica nessa intoxicação, é caracterizada por edema intramielínico. Esse edema é considerado resultado de alteração seletiva no sistema de transporte ativo de íons e água dependente de energia na membrana das células, como é proposto por Cho & Leipold (1977).

REFERÊNCIAS

- Barros C.S.L., Metzdorf L.L., Peixoto P.V. 1987. Ocorrência de surtos da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 1987; 7:101-107.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Pilati C., Barros, S.S., Castilhos L.M.L. 1992. *Senecio* spp. poisoning in cattle in southern Brazil. *Vet Human Toxicol.* 34:241-246.
- Barros C.S.L. 2010. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. p. 183-290. In: Santos RL, Alessi AC. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Roca.
- Barros C.S.L., Castilhos L.M.L., Rissi D.R., Kommers G.D. & Rech R.R. 2007. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 27(1):53-60.
- Cho D.Y., Leipold, H.W. 1977. Experimental spongy degeneration in calves. *Acta Neuropath.* 39:115-127.
- Corrêa A.M.R., Bezerra P.S.J., Pavarini S.P., Santos A.S., Sonne L., Zlotowski P., Gomes G. & Driemeier D. 2008. *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in Murrah buffaloes in Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):187-189.
- Cruz C.E.F., Karam F.C., Dalto A.C., Pavarini S.P., Bandarra P.M. & Driemeier D. 2010. Fireweed (*Senecio madagascariensis*) poisoning in cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):10-12.
- Driemeier D. & Barros C.S.L. 1992. Intoxicação experimental por *Senecio oxyphyllus* (Compositae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 12:33-42.
- Driemeier D., Barros C.S.L. & Pilati C. 1991. Seneciose em bovinos. *A Hora Vet.* 59:23-30.
- Gava A. & Barros C.S.L. 1997. *Senecio* spp. poisoning of horses in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 17(1):36-40.
- Graça D.L., Alessi A.C., Ecco R., Viott A.M. 2010. Patologia do sistema nervoso. p. 525-610. In: Santos R.L, Alessi A.C. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Roca.
- Grecco F.B., Schild A.L., Soares M.P., Marcolongo-Pereira C., Estima-Silva P. & Sallis E.S.V. 2010. Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):389-397.
- Grecco F.B., Schild A.L., Estima-Silva P., Marcolongo-Pereira C., Soares M.P. & Sallis E.S.V. 2011. Possible Association between Precipitation and Incidence of *Senecio* spp. Poisoning in Cattle in Southern Brazil. p. 154-157. In: Riet Correa F., Pfister J., Schild, A.L., Wierenga T.L. *Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins*.
- Hooper P.T. 1975. Spongy Degeneration in the Central Nervous System of Domestic Animals. Part I : Morphology. *Acta Neuropathologica.* 31:325-334.

- Ilha M.R., Loretto A.P., Barros S.S. & Barros C.S.L. 2001. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 21:123-138.
- Karam F.S.C., Soares M.P., Haraguchi M., Riet-Correa F., Méndez M.C. & Jarenkow J.A. 2004. Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 24(4):191-198.
- Lucena R.B., Rissi D.R., Maia L.A., Dantas A.F.M., Flores M.A., Nobre V.M.T., Riet-Correa F. & Barros C.S.L. 2010. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):447-452.
- Mckenzie R.A. 2012. Australia's Poisonous Plants, Fungi and Cyanobacteria. A guide to species of Medical and Veterinary importance. Collingwood: Csiro Publishing. 950 p.
- Méndez M.C., Riet-Correa F. & Schild A.L. 1987. Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 7:51-56.
- Orsini H., Bondan E.F., Sanchez M., Lallo M.A., Maiorka P.C., Dagli M.L.Z. & Graça D.L. 2007. Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. *Arq Neuropsiquiatr.* 65: 1070-1077.
- Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Pfister J, Schild A.L. & Dantas A.F.M. 2009. Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock. *Campina Grande/PB: UFCG.* 246 p.
- Rissi D.R., Pierezan F., Oliveira-Filho J.C., Lucena R.B., Carmo P.M.S. & Barros C.S.L. 2010. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):958-967.
- Rissi D.R., Rech R.R., Pierezan F., Gabriel A.L., Trost M.E., Brum J.S., Kommers G.D. & Barros C.S.L. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 27:261-268.
- Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):113-118.
- Santos J.C.A., Riet-Correa F., Simões S.V.D. & Barros C.S.L. 2008. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1): 1-14.
- Schild A.L., Ferreira J.L.M., Ladeira S.R.L., Soares M.P., Grecco F.B., Marcolongo-Pereira C. & Fiss L. 2008. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório regional de Diagnóstico no ano 2007. p.60-63. *Boletim do Laboratório Regional de diagnóstico.* Editora Universitária, UFPel, Pelotas.
- Summers B.A., Cummings J.F., DE Lahunta, A. 1995. *Veterinary Neuropathology.* St. Louis: Mosby, 527 p.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.M., Peixoto P.V., Döbereiner J. 2012. *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção.* 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus.
- Wouters A.T.B., Boabaid F.M., Watanabe T.T.N., Bandarra P.M., Correa G.L.F., Wouters F., Mafessoni R.M., Driemeier D. 2013. Intoxicação espontânea por *Cestrum intermedium* em bovinos no Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* 33(1):47-51.

Legendas das figuras

Fig 1. Aspecto histológico do fígado de bovino (Bov 3) intoxicado por *Senecio* sp., evidenciando fibrose, proliferação de ductos biliares, nódulos de regeneração, megalocitose e degeneração hepatocelular. HE, obj. 20x.

Fig 2. Degeneração esponjosa em tronco encefálico de bovino (Bov 10) intoxicado por *Senecio* sp. HE, obj. 20x.

Fig 3. Junção entre córtex e substância branca em telencéfalo de bovino intoxicado por *Senecio* sp. (Bov 6), com degeneração esponjosa e ocasionais astrócitos com núcleo discretamente tumefeito na substância cinzenta. Imunomarcção anti-S100, método da Estreptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno Vector Nova Red, obj. 40x.

Fig 4. Degeneração esponjosa na junção entre substâncias cinzenta e branca em telencéfalo de bovino intoxicado por *Senecio* sp. (Bov 5). Imunomarcção anti-GFAP, Método da Estreptavidina-biotina-peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 40x.

Fig 5. Junção entre córtex e substância branca do telencéfalo de bovino intoxicado por *Senecio* sp. (Bov 10) com marcação de paredes de vasos sanguíneos em vermelho. Imunomarcção anti-vimentina, método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, Cromógeno Permanent Red, obj. 20x.

Quadros

Quadro 1. Recuperações antigênicas, diluições e origem dos anticorpos primários utilizados na técnica de imuno-histoquímica

Anticorpo primário	Especificações do anticorpo	Recuperação Antigênica*	Diluição anticorpo	Referência comercial
Anti-GFAP	Policlonal coelho	TRIS-EDTA pH 9,0, 96 ^o C, 40 min	1:500	Dako
Anti-S100	Policlonal coelho	Citrato pH 6,0, 96 ^o C, 40 min	1:200	Dako
Anti-vimentina	Clone V9 camundongo	Citrato pH 6,0, 125 ^o C, 3 min	1:200	Zymed

* Obtida em panela de pressão

Quadro 2. Dados de histórico, achados clínicos e de necropsia de bovinos com intoxicação espontânea por *Senecio* sp. selecionados para o estudo de caracterização imuno-histoquímica das alterações encefálicas

Bovino	Procedência (Raça)	Sexo	Idade (anos)	Histórico e achados clínicos	Achados de necropsia
1	S. Jerônimo/RS (Aberdeen Angus)	F	5	Diarreia esverdeada, desidratação, agressividade, queda e morte quando movimentado. Morte na primavera.	Desidratação acentuada, ascite, edema acentuado em mesentério e abomaso. Fígado esbranquiçado, firme e com nódulos vermelho-pálidos aprox. 0,5 cm Ø.
2	(Holandesa) *	F	Adulta	Animal prenhe, apresentou queda e decúbito permanente. Morte em final de outono.	Ascite, edema e hemorragia em serosas, edema em mucosa abomasal, conteúdo ressecado em cólon espiral. Fígado firme, com áreas claras.
3	Caçapava do Sul/RS (Brangus)	M	2	Morte de 21/70 machos nascidos na propriedade, há um ano em potreiro com <i>Senecio</i> sp.; mortes na primavera. Tenesmo, apatia, sinais neurológicos incluindo andar a esmo.	Desidratação, edema acentuado em mesentério e abomaso, prolapso retal. Fígado pálido, diminuído e firme.
4	S. Jerônimo/RS (Aberdeen Angus)	F	6	500 bovinos/700ha campo nativo com senécio, predomínio <i>S. madagascariensis</i> . Agressividade. Mortes no verão, em média 10 bovinos/ ano.	Bom estado corporal, mucosas pálidas, prolapso retal, ascite, hidrotórax e hidropericárdio, hemorragias em omento e serosa omasal, edema acentuado em parede abomasal, conteúdo intestinal liquefeito. Fígado pálido, firme, reduzido, edema em parede de vesícula biliar, repleta.
5	Passinho Triunfo/RS (SRD)	F	1 e meio	Dificuldade locomoção, afastamento do rebanho, tenesmo, fezes ressecadas, febre. Morte no outono.	Regular estado corporal, sangue mais aquoso, hemorragias subepicárdicas, conteúdo retal ressecado. Fígado diminuído, pálido e firme.
6	Cristal/RS (Angus)	F	2	Morte 24/99 bovinos em campo nativo, superlotação. Emagrecimento, distensão abdominal, apatia, tenesmo e prolapso retal, diarreia/constipação. Mortes na primavera.	Mau estado corporal. Linfonodos hepáticos e mesentéricos succulentos. Fígado reduzido, pálido, firme, nodulações amareladas 0,1 a 0,3 cm Ø. Vesícula biliar com parede espessa e formações polipoides de 0,2 a 1cm Ø.
7	Pouso Novo/RS (SRD)	F	NI	Aprox. 50 bovinos/30 ha, pasto com <i>S. brasiliensis</i> , silagem e ração no cocho. Terceira morte (primavera) em 30 dias, diarreia, tenesmo, fezes escuras e aumento tempo coagulação.	Péssimo estado corporal, mucosas pálidas, ascite, edema de mesentério. Fígado reduzido, superfície irregular, firme, com pontos brancos e nódulos de 0,1 a 0,3 cm Ø.
8	Triunfo/RS (Red Angus)	M	1 e meio	Agressividade por 4 dias, tremores musculares, anorexia. Morte na primavera.	Bom estado corporal, petéquias em subcutâneo e músculos. Ascite, hidrotórax. Edema e petéquias em mesentério, perirrenal e parede intestinal. Ulcerações 0,5-1 cm Ø em abomaso, edema transmural acentuado em intestino grosso. Fígado firme, reticulado ao corte. Formações polipoides em vesícula biliar.
9	Dois Irmãos/RS (Cruza Nelore)	F	2 e meio	Anorexia, incoordenação, diarreia e incapacidade de levantar-se. Morte no início de verão.	Regular estado corporal, ascite moderada. Fígado reduzido, firme e vermelho-escuro, anastomoses portossistêmicas em vasos mesentéricos. Formações polipoides em vesícula biliar.
10	Cachoeira do Sul/RS (SRD)	M	2 e meio	Quatro mortes em 2011, em 2012 cinco animais/60, mais um doente. Diarreia escura e emagrecimento por aprox. 10 dias. Andar cambaleante, afastamento do lote, anorexia, polidipsia. Decúbito esternal. Mortes na primavera.	Regular estado corporal, prolapso retal, ascite e hidrotórax, edema acentuado em mesocólon, parede abomaso e vesícula biliar. Petéquias em serosa intestinal. Fígado firme, fina trama brancocenta ao corte, formações polipoides em vesícula biliar, anastomoses portossistêmicas em vasos mesentéricos.

F= fêmea; M= macho; * Dados sobre procedência não encontrados; aprox.= aproximadamente; SRD= sem raça definida

Quadro 3. Alterações histológicas em fígado de bovinos com intoxicação espontânea por *Senecio sp.*

Bovino	Fibrose	Proliferação ductos biliares	Nódulos regeneração	Megalocitose	Degeneração vacuolar de hepatócitos
1	+++	++	++	+	-
2	++	+	-	+	++
3	++	+++	+	++	-
4	+++	++	+	++	-
5	+++	+++	+	++	-
6	+++	+++	+++	+	+
7	+++	+++	+++	++	-
8	+++	+++	+	+++	-
9	++	+++	+	+++	-
10	+++	+++	+++	++	+

* Havia também congestão acentuada; ** colestase discreta e discreto infiltrado mononuclear; - ausente; + discreto; ++ moderado; +++ acentuado

Quadro 4. Alterações histológicas em encéfalo de bovinos com intoxicação espontânea por *Senecio sp.*

Bovino	Vacuolização			Alterações astrocíticas			Edema perivascular		
	Telen- céfalo	Tronco *	Cere- belo	Telen- céfalo	Tronco	Cere- belo	Telen- céfalo	Tronco	Cere- belo
1	++	+	+	-	-	-	+	-	-
2	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	+	+	-	-	-	-	+	-	-
4	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-
6	++	+++	+++	-	-	+	+	-	+
7	++	+	-	+	+	-	-	-	-
8	+	++	-	-	-	+	-	-	-
9	+++	++	-	+	-	-	+	-	-
10	++	+++	+	+	+	-	-	-	-

* Tronco = tronco encefálico

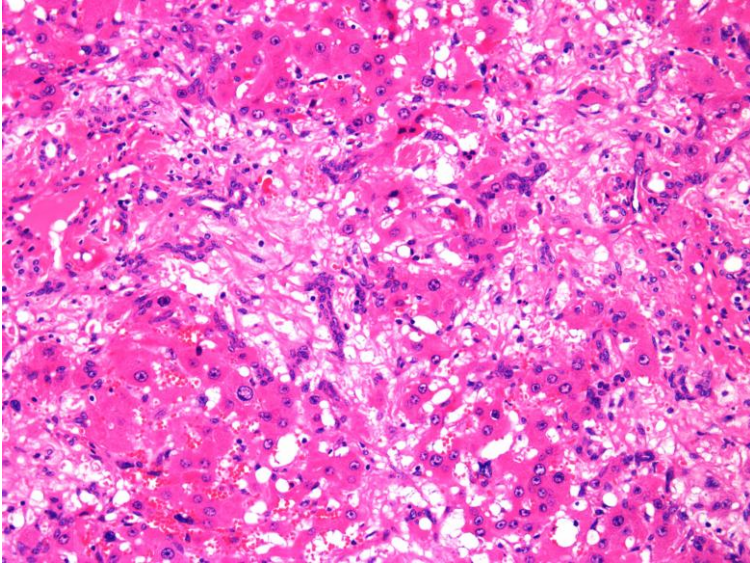


Fig 1.

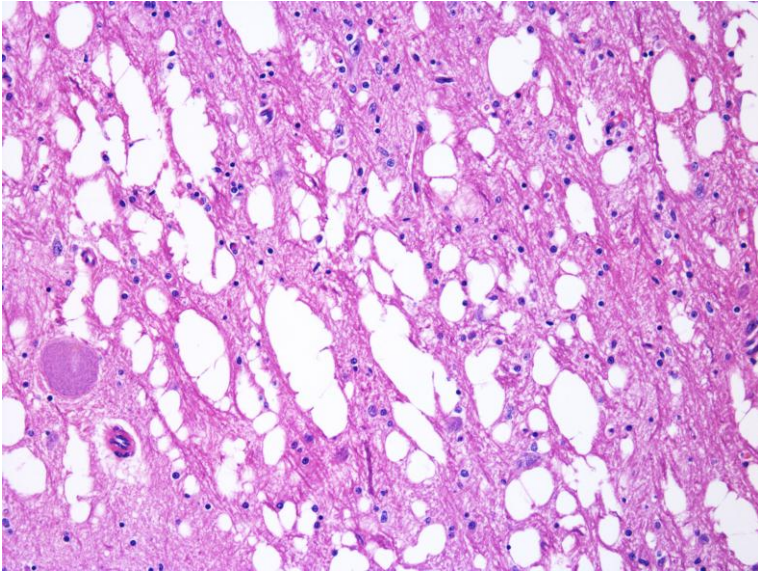


Fig 2.

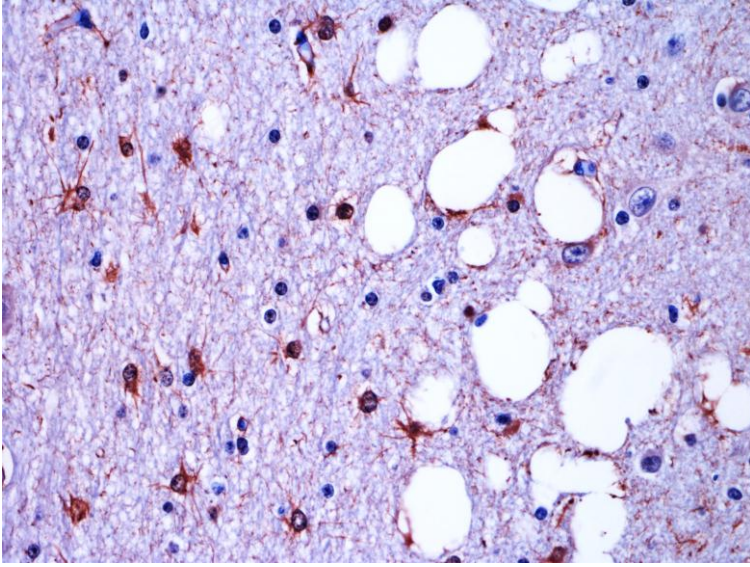


Fig 3.

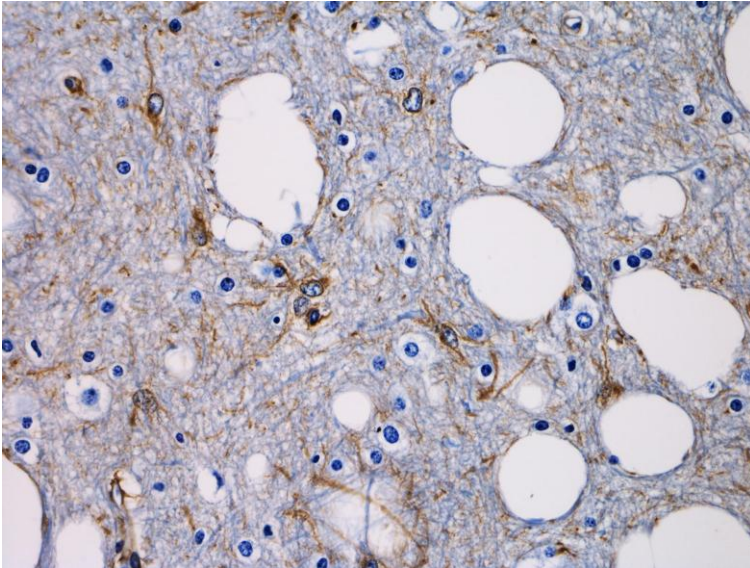


Fig 4.

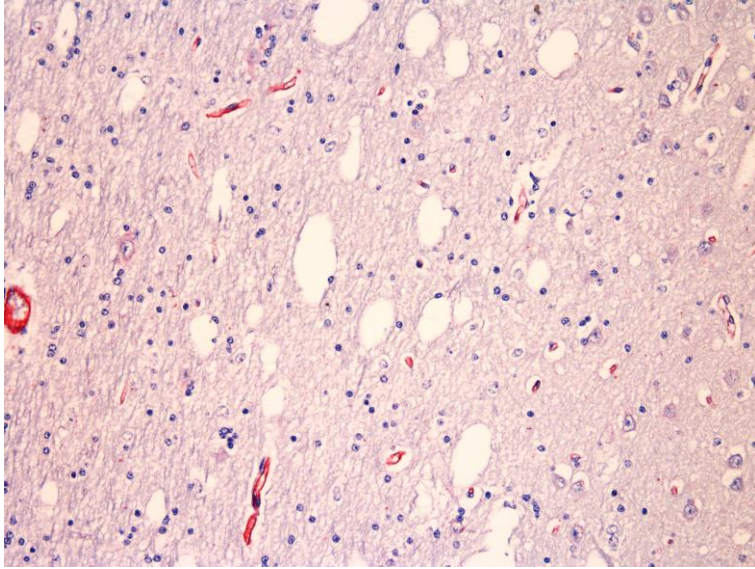


Fig 5.

5. CONCLUSÕES

As lesões encefálicas microscópicas em bovinos associadas a encefalopatia hepática são diferentes na hepatopatia aguda em relação à crônica.

Os astrócitos constituem importante alvo de lesão nos casos de encefalopatia por hepatopatia tóxica aguda em bovinos.

Em bovinos intoxicados por *Senecio* spp. a encefalopatia está relacionada a alterações histológicas encefálicas descritas como degeneração esponjosa, atribuídas a edema intramielínico.

A técnica de IHQ, com imunomarcção anti-GFAP e anti-S100, são ferramentas importantes para a avaliação das alterações encefálicas da encefalopatia hepática relacionada a hepatopatia tóxica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BANDARRA, P.M.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; CORRÊA, A.M.R.; PEDROSO, P.M.O., RAYMUNDO, D.L.; DRIEMEIER, D. Intoxicação natural por *Cestrum intermedium* em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n.1, p. 262-265, 2009.
- BARROS, C.S.L.; METZDORF, L.L.; PEIXOTO, P.V. Ocorrência de surtos da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 101-107, 1987.
- BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER D.; PILATI C.; BARROS, S.S.; CASTILHOS, LML. *Senecio* spp. poisoning in cattle in southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, 34:241–246. 1992.
- BARROS, C.S.L. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. In: Santos, R.L; Alessi, A.C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. Cap. 4, p. 183-290.
- COLODEL, E.M.; TRAVERSO, S.D.; SEITZ, A.L.; OLIVEIRA, F.N.; DRIEMEIER, D.; GAVA, A. Spontaneous poisoning by *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) in cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, p. 47-148, 2003.
- DRIEMEIER, D.; IRIGOYEN, L.F.; LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M.; BARROS, C. S. L. Intoxicação espontânea pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 12-18, 1999.
- GAVA, A.; STOLF, L.; PILATI, C.; NEVES, D.S.; VIGANÓ, L. Intoxicação por *Cestrum corymbosum* var. *hirsutum* (Solanaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n.3/4, p. 71-74, 1991.
- GAVA, A.; STOLF, L.; VARASCHIN, M.S. Intoxicação por *Cestrum intermedium* (Solanaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, p. 7-20, 1996.
- LUCENA, R.B.; RISSI, D.R.; MAIA, L.A.; DANTAS, A.F.M.; FLORES, M.A.; NOBRE V.M.T.; RIET-CORREA F.; BARROS C.S.L. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 447-452, 2010.
- MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 51-56, 1987.
- PAVARINI, S.P.; SOARES, M.P.; BANDARRA, P.M.; GOMES, D.C.; BANDINELLI, M.B.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Mortes súbitas em bovinos

causadas por *Amorimia exotropica* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 291-296, 2011.

PEDROSO, P.M.O.; OLIVEIRA, L.G.S.; CRUZ, C.E.F.; SOARES, M.P.; BARRETO, L.R.B.; DRIEMEIER, D. Doença do armazenamento lisossomal induzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* em bovinos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p.833-838, 2010.

RAYMUNDO, D.L.; BEZERRA JUNIOR, P.S.; BANDARRA, P.M.; SANTOS, A.S.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P.; CORRÊA, A.M.R.; DIAS, M.M.; DRIEMEIER, D. Intoxicação espontânea pelas larvas de *Perreyia flavipes* em bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, 163-166, 2009.

SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D.; BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SOARES, M.P.; PAVARINI, S.P.; ADRIEN, M.L.; QUEVEDO, P.S.; SCHILD, A.L.; PEIXOTO, P.V.; CRUZ, C.E.F., DRIEMEIER, D. *Amorimia exotropica* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23 n. 6, p. 1226-1229, 2011.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995. 527 p.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 566 p.

TRAVERSO, S.D.; CORRÊA, A.M.R.; SCHMITZ, M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 211-216, 2004.

VARASCHIN, M.S.; WOUTERS, F.; PETTA, I., BEZERRA JUNIOR, P.S.; WOUTERS, A.T.B. Natural and experimental poisoning of bovines by *Cestrum corymbosum* Schlecht in the State of Minas Gerais, Brazil. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A.L.; WIERENGA, T. **Poisoning by Plants, Mycotoxins and related toxins**, 2011. Cap. 34, p. 227-230.