

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

**INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* EM OVINOS**

**Flademir Wouters**

Porto Alegre

2013

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

**INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* EM OVINOS**

**Autor:** Flademir 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, Fladimir  
INTOXICAÇÃO POR Trema micrantha EM OVINOS /  
Fladimir Wouters. -- 2013.  
31 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. Intoxicação. 2. Ovino. 3. Trema micrantha. 4. Pneumopatia. 5. Lesões pulmonares. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

FLADEMIR WOUTERS

INTOXICAÇÃO POR *Trema micrantha* EM OVINOS

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, por todas as Graças concedidas.

Aos meus pais, Aldo e Rumilda, exemplos de fé, dignidade e dedicação.

A minha irmã Elizete que, desde os primeiros anos de vida, me apoiou nas minhas tarefas e na caminhada da vida Cristã. Ao meu cunhado Jorge, pela grande amizade. Aos meus sobrinhos Henrique e Rafael, pelas alegrias proporcionadas.

A Angelica, minha eterna namorada, por todas as dificuldades e desafios que já enfrentamos juntos.

Aos nossos filhos Lídia, Daniel, Pedro e João Paulo, que colaboraram para que este período que passamos longe de casa fosse prazeroso.

Ao meu orientador, Dr. David Driemeier, pela confiança e oportunidade que nos concedeu de ampliarmos os conhecimentos em Patologia e, especialmente, pela amizade gerada neste período.

A todos os colegas e amigos do SPV-UFRGS, pela colaboração e pelas oportunidades de crescimento profissional.

Aos colegas e amigos do DMV-UFLA, especialmente a Mary e ao Pedro, que me deram suporte durante o período em que estive afastado.

A UFLA, a CAPES e o CNPq, por oportunizarem este aperfeiçoamento profissional.

## RESUMO

*Trema micrantha* é uma árvore nativa do Brasil que apresenta folhas palatáveis para herbívoros, é conhecida como natural e/ou experimentalmente tóxica para caprinos, equinos, coelhos e bovinos. Casos de intoxicação espontânea em ovinos indicaram mecanismos patogênicos diferentes na intoxicação nessa espécie, com quadro clínico e patológico respiratório na maioria dos casos. Este estudo resultou em dois artigos científicos, o primeiro descreve os achados clinicopatológicos de dois casos de intoxicação espontânea e dois casos de intoxicação experimental. No segundo artigo é descrita a intoxicação experimental por *Trema micrantha* em cinco ovinos, dos quais quatro tiveram sinais clínicos respiratórios acentuados e morte após ingestão da terceira dose de folhas da planta, com verificação de dose tóxica de 20 a 50g/kg de folhas de *T. micrantha*. Na necropsia foram constatados mucosas cianóticas, pulmões não colabados, pesados, com impressão das costelas na superfície e conteúdo espumoso vermelho em traqueia e brônquios, além de múltiplas petéquias subpleurais, enfisema subcutâneo em região cervical ventral ou porção mediastinal dorsal. Os achados histológicos foram principalmente pulmonares, com espessamento de septos alveolares por proliferação difusa de pneumócitos tipo II, conferindo aspecto adenomatoso a algumas áreas. Os pneumócitos apresentavam alterações morfológicas e, em algumas áreas, estavam descamados para a luz alveolar, ora formando sincícios. Havia também hiperplasia do epitélio bronquiolar, com células com núcleo hipercromático e volumoso e redução na quantidade de cílios. Imunomarcção para epitélio (anti-citoqueratina), proliferação celular (anti-Ki-67) e histiócitos (MAC 387), bem como microscopia eletrônica de transmissão foram empregadas para a caracterização das alterações pulmonares, evidentes em pneumócitos e epitélio bronquiolar.

## ***ABSTRACT***

*Trema micrantha* is a native Brazilian tree which has leaves palatable for herbivores. The plant is known to be toxic to goats, horses, rabbits, and experimentally to cattle. Spontaneous poisoning occurred in sheep, in which atypical pathogenetic mechanisms associated with respiratory clinical signs and pathological findings were observed in most cases. This study resulted in two papers. The first describes the clinical and pathological findings of two cases of spontaneous and two cases of experimental poisoning by *T. micrantha*. The second article describes the experimental poisoning by *T. micrantha* in five sheep; four of which had marked respiratory clinical signs and death after the third dose of the plant. Illness was induced with 20 to 50g/kg of *T. micrantha* leaves. At necropsy, there were cyanotic mucous membranes; red, heavy and collapsed lungs with rib markings, red foamy contents in trachea and bronchi, and multiple subpleural petechiae, subcutaneous emphysema in the ventral cervical area or in the mediastinic dorsal portion. Histological findings were seen mainly in lungs, and included alveolar septa thickening by diffuse proliferation of type II pneumocytes, resulting in areas of adenomatous aspect; pneumocytes showed morphological changes and, in some areas, were loosed to the alveolar lumen, sometimes forming syncytia. There also was hyperplasia of bronchial epithelium with hyperchromatic nucleus and considerable loss of cilia. To characterize the pulmonary changes, anti-cytokeratin, anti-Ki-67 and anti-myeloid/histiocyte immunostaining apart of transmission electron microscopy, were employed and demonstrated relevant changes of pneumocytes and bronchiolar epithelium.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 7  |
| 2. ARTIGO 1. “PNEUMOTOXICOSIS IN SHEEP CAUSED BY INGESTION OF <i>Trema micrantha</i> ” .....                     | 9  |
| 3. ARTIGO 2. “ <i>TREMA MICRANTHA</i> COMO CAUSA DE PNEUMOPATIA TÓXICA EM OVINOS – REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL”..... | 14 |
| 4. CONCLUSÕES .....  | 30 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 31 |



## 1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos é uma atividade rural tradicional no Rio Grande do Sul. No entanto, nos últimos anos, mudanças têm sido verificadas na forma de criar ovinos, os quais antes ocupavam grandes extensões de campo nativo, em baixas lotações por hectare. Atualmente, há muitas criações pequenas, porém com maior densidade animal/área; a alimentação não se baseia mais, exclusivamente, em campo nativo e ocorre em regiões sem tradição na criação, onde podem ser encontradas espécies vegetais, potencialmente, tóxicas para a espécie.

Depois das causas parasitárias, a principal causa de morte em ovinos no Estado são as intoxicações e, dentre elas, as provocadas por plantas.

*Trema micrantha* é uma árvore nativa do Brasil, com crescimento rápido e de surgimento natural após desmatamentos. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, além dos estados da Região Sul do Brasil. No Brasil, *T. micrantha* tem sido utilizada na recuperação de solos degradados, ou após queimadas (LORENZI, 2008). É incriminada como natural e/ou experimentalmente tóxica para caprinos, equinos, coelhos e bovinos. Em pequenas propriedades a planta é utilizada na alimentação de bovinos e caprinos, em épocas de escassez de forragem. Derrubadas de árvores por ação de podas ou vento constituem importantes fatores de risco nos casos de intoxicação (RIET-CORREA et al., 1993; BANDARRA et al., 2010). *T. micrantha* tem sido descrita como causa de intoxicação natural em espécies domésticas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, como caprinos (TRAVERSO et al. 2003, TRAVERSO et al. 2005, GAVA et al., 2010) e equinos (BANDARRA et al., 2010), nestes atribuída à ampla distribuição e à palatabilidade da planta, associadas à alta sensibilidade da espécie (BANDARRA et al., 2011). Nas intoxicações naturais e experimentais relatadas na literatura, o quadro clinicopatológico se caracteriza por insuficiência hepática aguda, com necrose hepatocelular acentuada (TRAVERSO et al. 2003, TRAVERSO et al. 2005, BANDARRA et al., 2010, GAVA et al., 2010).

Dois casos naturais de intoxicação por *T. micrantha* em ovinos foram diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária (SPV) da FAVET/UFRGS. Não há relatos de intoxicação natural nem experimental por *T. micrantha* em ovinos e, em um dos ovinos que morreram, o quadro clinicopatológico se caracterizava por alterações respiratórias. Em todas as outras espécies, nas quais a intoxicação por *T. micrantha* foi

estudada, não foram observadas alterações que envolvessem o sistema respiratório. Essas observações motivaram o estudo da intoxicação por *Trema micrantha* em ovinos, incluindo sua reprodução experimental.

**ARTIGO 1.**

Neste item é apresentado o Artigo “**Pneumotoxicosis in Sheep Caused by Ingestion of *Trema micrantha***”, publicado na Revista Veterinary Pathology.

## Article

## Pneumotoxicosis in Sheep Caused by Ingestion of *Trema Micrantha*

F. Wouters<sup>1</sup>, A. T. B. Wouters<sup>1</sup>, T. T. N. Watanabe<sup>1</sup>, M. P. Soares<sup>2</sup>, C. E. F. Cruz<sup>1</sup>, and D. Driemeier<sup>1</sup>

Veterinary Pathology  
00(0) 1-4  
© The Author(s) 2013  
Reprints and permission:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0300985813478208  
vet.sagepub.com



### Abstract

*Trema micrantha*, a fast-growing tree distributed throughout the Americas, produces palatable leaves that have been associated with hepatic necrosis and acute death when consumed by livestock. This report describes fatal pulmonary disease of sheep triggered by consumption of *Trema micrantha*. Affected sheep had severe progressive dyspnea for a few days before death. Subcutaneous and mediastinal emphysema, reddened lungs, interalveolar septal thickening, and diffuse type II pneumocyte proliferation were the main pathological findings. After ingesting 77.5 and 102.5 g/kg (divided in 3 doses, at 30-day intervals) of *T. micrantha* leaves, 2 additional sheep developed the same condition. These findings indicate that *T. micrantha* toxicosis should be considered in the differential diagnosis of ovine respiratory disease.

### Keywords

pneumotoxicity, respiratory insufficiency, sheep, *Trema micrantha*

*Trema micrantha* is a fast-growing pioneer tree widely distributed across tropical and subtropical zones in South, Central, and North America. This plant has been used in reforestation systems, particularly for the recovery of degraded soils.<sup>9</sup> *T. micrantha* leaves are highly palatable and readily consumed by herbivores. Ingestion of this plant has been associated with poisoning in goats<sup>5,16</sup> and horses.<sup>2</sup> Poisoning by *T. micrantha* is characterized predominantly by acute hepatic insufficiency due to centrilobular hepatic necrosis<sup>16</sup> and is often accompanied by neurologic signs<sup>2</sup> of hepatic encephalopathy.<sup>6</sup> In southern Brazil, sheep were traditionally grazed in large extensions of the native rangelands; recently, however, sheep have been intensively managed on small pastures where supplementation of the daily feed often includes alternative sources of forage. Toxicosis, including those caused by plants, is a leading cause of death in sheep in southern Brazil.<sup>12</sup> This report describes *T. micrantha* poisoning in sheep with emphasis on pneumopathy.

### Materials and Methods

#### Natural Cases: Clinical History and Pathological Characteristics

Clinical information was obtained during visits to the farm. Necropsy was performed on 2 dead sheep. Representative samples of major organs were fixed in 10% neutral buffered formalin. Trimmed tissues were routinely processed, paraffin embedded, and sectioned at 5 µm. Staining methods included hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome (MT), and immunohistochemistry (Tables 1 and 2). Necropsy specimens

from the lungs of 2 sheep that died from nontoxic, infectious, or neoplastic diseases served as the controls.

#### Experimental *T. Micrantha* Toxicosis

To reproduce the respiratory disease experimentally, 2 Maedi-Visna-seronegative, 1-year-old Texel sheep (sheep Nos. 3 and 4) were fed *T. micrantha* leaves in 3 doses at 30-day intervals. Dose calculation was based on a trial in goats.<sup>15</sup> Sheep No. 3 consumed 20, 22.5, and 35 g/kg body weight at each interval, respectively; sheep No. 4 consumed 22.5, 30, and 50 g/kg body weight. Pathological examination was conducted in the experimental cases as for the natural cases. Immediately after euthanasia, lung samples from the sheep No. 3 were fixed in 2% glutaraldehyde + 2% paraformaldehyde and sodium cacodylate buffer solution, dehydrated in ethanol, and embedded in epoxy resin. Semithin sections were stained with methylene blue. Ultrathin sections from selected areas of resin blocks

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

<sup>2</sup> Laboratório Regional de Diagnóstico, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Pelotas, Rio Grande do Sul, 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

**Table 1.** Immunohistochemistry Techniques.

| Antigen            | Antibody Clone       | Antigen Retrieval                                    | Antibody Dilution | Detection Method                              | Source            |
|--------------------|----------------------|--|-------------------|---|-------------------|
| Cytokeratin        | AE1/AE3 <sup>a</sup> | Citrate pH 6.0, 125°C,<br>3 minutes, pressure cooker | 1:80              | Mach 4 HRP <sup>b</sup> ;<br>diaminobenzidine | Dako <sup>c</sup> |
| Myeloid/histiocyte | MAC 387 <sup>a</sup> | TRIS-EDTA pH 9.0,<br>10 minutes, microwave oven      | 1:300             | Mach 4 HRP <sup>b</sup> ;<br>diaminobenzidine | Dako              |
| Ki-67              | MIB-1 <sup>a</sup>   | Citrate pH 6.0, 125°C,<br>7 minutes, pressure cooker | 1:300             | Mach 4 HRP <sup>b</sup> ;<br>diaminobenzidine | Dako              |

<sup>a</sup>Monoclonal mouse anti-human.<sup>b</sup>Biocare Medical, LLC (Concord, California).<sup>c</sup>Dako, Denmark A/S (Glostrup, Denmark).**Table 2.** Immunohistochemistry Results in Lungs of 4 Sheep Exposed to *Trema Micrantha*.

| Case No.        | Anti-CK <sup>a</sup> | Anti-Ki67 <sup>a</sup> | Anti-Ki67 <sup>b</sup> | Anti-MAC387 <sup>a</sup> |
|-----------------|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1               | 1.2                  | 0.4                    | 0.1                    | 0.2                      |
| 2               | 7                    | 3.5                    | 14.8                   | 0.2                      |
| 3               | 8.6                  | 3.6                    | 6.1                    | 0.3                      |
| 4               | 10.8                 | 3.1                    | 15.5                   | 0.3                      |
| C1 <sup>c</sup> | 1.4                  | 0.3                    | 0.1                    | 0.3                      |
| C2 <sup>c</sup> | 0.4                  | 0                      | 0.6                    | 0.3                      |

<sup>a</sup>Mean number of proliferating cells in 10 randomly selected alveoli.<sup>b</sup>Mean number of proliferating cells in 10 randomly selected bronchioles.<sup>c</sup>Control sheep.

were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. An electron microscope was used at 80 kV.

## Results

### Natural Cases: Clinical History and Pathological Characteristics

On a farm in southern Brazil, a flock of sheep grazed native pastures and was occasionally fed leaves from mulberry (*Morus nigra*) and grape-Japan (*Hovenia dulcis*). Three days after receiving the pruned branches from a *T. micrantha* tree, two 1-year-old mixed Texel sheep fell ill. Sheep No. 1 died 5 hours after the onset of clinical signs. Sheep No. 2 developed lethargy, ataxia, and severe, progressive dyspnea with death 11 days after consuming the plant. At necropsy, both sheep were in good nutritional status. Sheep No. 1 had a pale liver with enhanced lobular pattern and dark red lungs. Sheep No. 2 had cyanotic and congested mucous membranes, cervical subcutaneous and mediastinal emphysema, yellowish liver, red lungs with rib markings (Fig. 1), scanty tracheal and bronchial foam, and subepicardial hemorrhages.

Histologically, sheep No. 1 had severe centrilobular hepatic necrosis and severe pulmonary edema and congestion. Sheep No. 2 had pulmonary congestion with thickening of interalveolar septa and diffuse type II pneumocyte proliferation. Syncytial cells, hyaline membranes, and occasional neutrophils within alveoli and bronchioles were also observed. Immunohistochemistry results are summarized in Table 2. Histologic findings in the liver included hepatocellular vacuolation and tawny

pigmentation within macrophages (both mainly in lobular centers), expanded sinusoids and centrilobular veins, reduced sinusoidal eosinophilic globules, and hepatomegalocytes. Lesions in other tissues included diffuse myocardial congestion, eosinophilic globules in renal tubules and urinary spaces, and multifocal hemorrhages in the thymus.

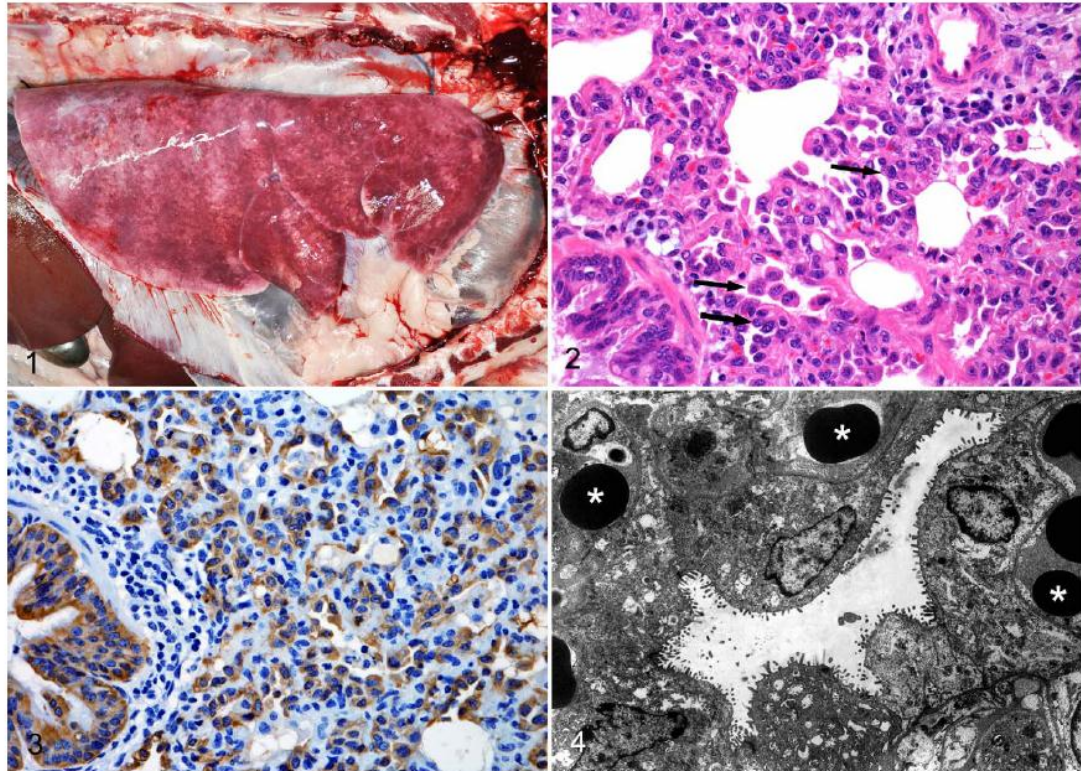
### Experimental *T. Micrantha* Toxicosis

The mean time of ingestion of each dose was 4 hours and 30 minutes. Nine days after the first dose, sheep No. 3 had anorexia, hyperthermia (40°C–41°C), tachypnea (60–160 breaths per minute), and severe dyspnea, with cyanotic mucosae and mild mucinous nasal discharge. However, the sheep spontaneously recovered 3 days after the initial dose. The sheep appeared asymptomatic after the second dose but responded severely 78 hours after the third dose, whereupon it was euthanized *in extremis*. Clinical illness in sheep No. 4 was not recognized until 5 days after the third dose, when it also was euthanized *in extremis*. Postmortem examination revealed gross and histologic (Figs. 2 and 3) lesions indistinguishable from those in sheep No. 2. Immunohistochemistry results are summarized in Table 2.

Upon evaluation of MT-stained sections, no increase in pulmonary interstitial fibrous tissue was identified in naturally or experimentally exposed sheep compared with controls. Ultrastructurally, type I pneumocytes had fragmented or absent cytoplasm but intact basal lamina. Type II pneumocytes covered extensive areas of the alveolar surface (Fig. 4).

## Discussion

The epidemiological, clinical, and pathological findings in this study provide evidence for the toxicity of *T. micrantha* in sheep. Poisoning by *T. micrantha* has been reported in other herbivores; however, the reports were focused on the hepatotoxic effects.<sup>2,5,16</sup> Although ingestion of *T. micrantha* was associated with hepatic necrosis in sheep, the most striking finding in this study was pneumotoxicosis, similar to that in acute respiratory distress syndrome, which is characterized by acute onset, severe hypoxemia, and diffuse alveolar damage with proteinic edema and hyaline membrane formation.<sup>3,8</sup> In South Africa, ingestion of *Crotalaria globifera* and *Crotalaria dura* has been associated with pulmonary adenomatosis of sheep



**Figure 1.** Thoracic cavity; sheep No. 2, naturally exposed to *T. micrantha*. The lung is reddened and glistening with rib markings. Note mediastinal emphysema. **Figure 2.** Lung; sheep No. 3, experimental *T. micrantha pneumotoxiosis*. Interalveolar septa are thickened with diffuse proliferation of type II pneumocytes (arrows). HE. **Figure 3.** Lung; sheep No. 3, experimental *T. micrantha pneumotoxiosis*. Proliferation of type II pneumocytes is demonstrated by anticytokeratin immunohistochemistry of a serial section of the lung depicted in Fig. 2. Peroxidase-labeled avidin-biotin complex immunohistochemistry, hematoxylin counterstain. **Figure 4.** Lung; sheep No. 4, experimental *T. micrantha pneumotoxiosis*. Alveolar space lined by type II pneumocytes; lamellar bodies have scarce to no content. Note the thickened barrier between erythrocytes (asterisks) and the air space. Electron microscopy.

and horses. In Brazil, ingestion of *Crotalaria sp* has also been linked to hepatopathy and pneumopathy in pigs and horses.<sup>14</sup>

The toxic components in *T. micrantha* are unknown. However, *Trema tomentosa* (*Trema aspera*), a *Trema* species endemic to Australia, contains trematoxin,<sup>11</sup> a glycoside that can induce hepatocellular necrosis in several animal species.<sup>7,17</sup> The pathogenesis of the pulmonary lesions induced by *T. micrantha* poisoning in sheep is likewise unknown but could be the result of damage to alveolar and bronchiolar epithelial cells and, consequently, the integrity of the blood-air barrier. In cattle, acute pulmonary edema and emphysema have been associated with the ingestion of plants rich in L-tryptophan, which results in the ruminal production of 3-methylindole. Subsequently, pulmonary mixed function oxidases can convert 3-methylindole to intermediate electrophilic products that induce pneumotoxiosis.<sup>3,8</sup>

In sheep No. 2 and the experimental sheep (Nos. 3 and 4), the pulmonary lesions included diffuse alveolar damage, indicative of type I pneumocyte injury, increased vascular permeability, hyaline membrane formation, and type II pneumocyte proliferation. Type II pneumocytes can be indistinguishable from alveolar macrophages by light microscopy,<sup>3</sup> so immunohistochemistry for cytokeratins was used to document type II pneumocyte proliferation in the lungs of the naturally and experimentally exposed sheep. No difference in the number of macrophages (anti-MAC387 IHC) was observed when comparing naturally or experimentally exposed sheep to controls. Type II pneumocyte proliferation was also confirmed by immunohistochemistry for Ki-67 antigen. Moreover, proliferation of the bronchiolar epithelial cells was observed and confirmed by anti-Ki-67 immunohistochemistry. Electron microscopy also showed proliferation of type II pneumocytes and

thickened blood-air barrier, which, although a normal mechanism of alveolar repair, impairs gas exchange.

Sheep No. 1, which died 5 hours after onset of clinical signs, had the typical hepatic necrosis of *T. micrantha* toxicosis, which has been reported in herbivores.<sup>2,5,15,16</sup> The hepatic or pulmonary manifestations in sheep could be due to factors such as variation in species susceptibility, individual susceptibility, and the amount of ingested plant material. The emphysema of the mediastinum and subcutis of the neck in these sheep could have resulted from increased intra-alveolar pressure generated by increased expiratory effort and altered interstitial permeability. Viral diseases, such as pulmonary adenomatosis and Maedi-Visna, cause chronic respiratory distress and progressive respiratory insufficiency in sheep.<sup>4,10</sup> Bacterial or viral pneumonia could also induce respiratory insufficiency, and altered leukograms could reflect such infection.<sup>13</sup> However, the hematologic values and the bacterial cultures from specimens of the experimental sheep were within laboratory reference range and devoid of growth, respectively. Severe ovine respiratory disease in bluetongue viral infection has been associated with dysphagia and esophageal myonecrosis,<sup>1</sup> two findings that were absent in the sheep of this study. In summary, the evidence indicates that *T. micrantha* toxicosis should be considered in the differential diagnosis of ovine respiratory disease.

#### Acknowledgement

We thank Dr Nelson I. Matzenbacher for the identification of *T. micrantha*.

#### Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this paper.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (grant 478266/2012-0).

#### References

1. Antoniassi NAB, Pavarini SP, Henzel A, et al. Aspiration pneumonia associated with oesophageal myonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. *Vet Rec.* 2010;**166**:52–53.
2. Bandarra PM, Pavarini SP, Raymundo DL, et al. Trema micrantha toxicity in horses in Brazil. *Equine Vet J.* 2010;**42**:456–459.
3. Caswell JL, Williams KJ. Respiratory system. In: Maxie MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007:523–653.
4. Driemeier D, Moojen V, Faccini GS, et al. Adenomatose pulmonar ("Jaagsiekte") em ovino no Rio Grande do Sul. *Cienc Rural.* 1998;**28**:147–150.
5. Gava A, Luciola J, Furlan FH, et al. Intoxicação por Trema micrantha (Ulmaceae) em caprinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq Vet Bras.* 2010;**30**:191–194.
6. Häussinger D, Schliess F, Kircheis G. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;**17**:256–259.
7. Hill BD, Wills LD, Dowling RM. Suspected poisoning of horses by Trema aspera (poison peach). *Aust Vet J.* 1985;**6**:107–108.
8. López A. Respiratory system, mediastinum and pleurae. In: McGavin MD, Zachary JF, ed. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2012:458–538.
9. Lorenzi H. *Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 5th ed. São Paulo, SP, Brazil: Plantarum; 2008.
10. Moojen V, Riet-Correa F, Maedi-Visna dos ovinos. In: Riet-Correa F, Schild AL, Méndez MC, Lemos RAA, Borges JRJ, eds. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3rd ed. Santa Maria, RS, Brazil: Pallotti; 2007:174–179.
11. Oelrichs PB. Isolation and purification of trematoxin from Trema aspera. *Phytochemistry.* 1968;**7**:1691–1693.
12. Rissi DR, Pierezan F, Oliveira Filho JC, et al. Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2010;**30**: 21–28.
13. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, et al. *Veterinary Medicine*. 10th ed. Edinburgh, UK: Saunders Elsevier; 2007.
14. Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, et al. *Plantas Tóxicas do Brasil*. 2nd ed. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Helianthus; 2012: 192–204.
15. Traverso SD, Corrêa AMR, Pescador CA, et al. Intoxicação experimental por Trema micrantha em caprinos. *Pesq Vet Bras.* 2002;**22**:141–147.
16. Traverso SD, Colodel ED, Loretti AP, et al. Intoxicação natural por Trema micrantha em caprinos. *Cienc Rural.* 2003;**33**: 133–136.
17. Trueman KF, Powell MW. Suspected poisoning of camels by Trema tomentosa (poison peach). *Aust Vet J.* 1991;**68**:213–214.

## ARTIGO 2.

Neste item é apresentado o artigo “***Trema micrantha* como causa de pneumopatia tóxica em ovinos – reprodução experimental**”, que será submetido a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.



Trabalho...

## ***Trema micrantha* como causa de pneumopatia tóxica em ovinos – reprodução experimental<sup>1</sup>**

Flademir Wouters<sup>2</sup>, Angelica T.B. Wouters<sup>2</sup>, Verônica M. Rolim<sup>2</sup>, Mauro Pereira Soares<sup>3</sup> e David Driemeier<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Wouters F., Wouters A.T.B., Rolim V.M., Soares M.P. & Driemeier D. 2013. [*Trema micrantha* as cause of toxic pneumopathy in sheep - experimental reproduction] *Trema micrantha* como causa de pneumopatia tóxica por em ovinos – reprodução experimental. *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](mailto:davetpat@ufrgs.br)

This paper describes the experimental *Trema micrantha* poisoning in sheep. Four from five sheep showed marked respiratory distress and death after ingestion of the third dose of plant leaves. The most frequent clinical findings were tachypnea, dyspnea, rhythmic contraction of the nostrils, cyanotic mucous membranes, mucous nasal discharge, hyperthermia, abdominal distension, increased volume and crepitation of parotid region, walking with the legs kept away laterally and sternal recumbency. *T. micrantha* proved to be toxic to sheep at 20 to 50g/kg bodyweight. At necropsy, cyanotic mucous membranes, subcutaneous emphysema in the ventral area of cervical region or dorsal mediastinum, heavy and collapsed lungs with rib markings, red frothy fluid in the lumens of the trachea and primary bronchi, and several subpleural petechiae. Microscopic examination of lung tissue sections revealed that the tissue was characterized by thickening of the alveolar septa by diffuse type II pneumocytes proliferation, conferring an adenomatous appearance to some areas. These pneumocytes had large and hyperchromatic, sometimes bizarre nucleus or were multinucleate, with evident nucleoli. In some areas there was desquamated pneumocytes in the alveolar lumen, sometimes forming syncytia. There also was bronchiolar epithelium proliferation, conferring to the mucosa more than one epithelial cell layer, these cells had large and hyperchromatic nuclei and reduction in the amount of cilia. The proliferative changes of pneumocytes and bronchiolar epithelium were evaluated by anti-cytokeratin and anti-Ki-67 immunostaining. In order to differentiate pneumocytes and alveolar macrophages, we used anti-monocyte marker (MAC387). One sheep showed clinicopathological findings of acute liver failure with hepatocellular necrosis after ingestion of 25g/kg *T. micrantha*. The experimental poisoning by *T. micrantha* in sheep resulted in predominantly respiratory clinicopathological findings, confirming the results of spontaneous poisoning.

INDEX TERMS: Plant poisoning, *Trema micrantha*, diseases of sheep, lung lesions, immunohistochemistry.

**RESUMO.** A intoxicação experimental por *Trema micrantha* em cinco ovinos é descrita. Quatro ovinos apresentaram sinais clínicos respiratórios acentuados e morte após ingestão da terceira dose de folhas da planta. As manifestações clínicas mais frequentes nesses casos foram taquipneia, dispneia, retração ritmada das narinas, mucosas cianóticas, corrimento nasal mucoso, hipertermia, aumento de volume abdominal bilateral e na região parotídea, incluindo crepitação à palpação, membros lateralmente afastados ao caminhar e decúbito esternal. *T. micrantha* mostrou-se tóxica para ovinos na dose de 20 a 50g/kg de peso animal. Na necropsia desses ovinos foram observados, além das mucosas cianóticas, enfisema subcutâneo em região cervical ventral ou porção mediastinal dorsal, pulmões não colabados, pesados, com impressão das costelas na superfície e conteúdo espumoso vermelho em traqueia e brônquios, além de múltiplas petéquias subpleurais. Na avaliação histológica predominaram alterações pulmonares, com espessamento de septos alveolares por proliferação difusa de pneumócitos tipo II, conferindo aspecto adenomatoso a algumas áreas. Os pneumócitos apresentavam núcleo volumoso, hiper Cromático, ora bizarro ou eram multinucleados, havia nucléolos evidentes e, em algumas áreas, os pneumócitos estavam descamados para a luz alveolar, ora formando sincícios. Havia também proliferação do epitélio bronquiolar, com formação de mais de uma camada celular, núcleos hiper Cromáticos e volumosos e redução na quantidade de cílios. As alterações proliferativas dos pneumócitos e do epitélio

bronquiolar foram evidenciadas pela imunomarcção anti-citoqueratina e anti-Ki-67 e, para a diferenciação entre pneumócitos e macrófagos alveolares, foi empregada IHQ anti-mieloide/histiócitos. Um ovino apresentou quadro clinicopatológico de insuficiência hepática aguda, com necrose hepatocelular acentuada após ingestão de 25g/kg de *T. micrantha*. A intoxicação experimental por *T. micrantha* em ovinos resultou em quadro clinicopatológico, predominantemente, respiratório na maioria dos casos, confirmando os resultados observados em casos de intoxicação espontânea.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Intoxicação por plantas, *Trema micrantha*, doença de ovinos, lesões pulmonares, imuno-histoquímica.

## INTRODUÇÃO

*Trema micrantha*, popularmente conhecida como grandiúva, crindiúva, pau-pólvora e periquiteira, é uma árvore da Família Cannabaceae, nativa do Brasil, que atinge 5 a 20 m de altura. Ocorre nos estados da Região Sul do Brasil, em Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. No Brasil, *T. micrantha* é empregada na recuperação de solos degradados ou após queimadas (Lorenzi 2008). Em pequenas propriedades é utilizada inclusive na alimentação de bovinos e caprinos em épocas de escassez de forragem (Traverso et al. 2003, Gava et al. 2010), pois suas folhas são palatáveis para animais de produção (Riet-Correa et al. 2009). Derrubadas de árvores por ação de podas ou vento constituem importantes fatores de risco nos casos de intoxicação (Riet-Correa et al. 2009, Bandarra et al. 2010).

A toxidez de *T. micrantha* foi caracterizada em intoxicações experimentais em caprinos (Traverso et al. 2002), equinos (Bandarra et al. 2011), bovinos (Traverso et al. 2004) e coelhos (Traverso et al. 2000). Em caprinos a intoxicação foi induzida com doses a partir de 30g/kg de peso vivo, com sinais clínicos iniciando dois dias após ingestão, caracterizados principalmente por anorexia, tenesmo e sinais de encefalopatia hepática (EH) (Traverso et al. 2002). Na intoxicação experimental em equinos foram relatados sinais clínicos entre 18 e 96h após o consumo de folhas da planta, evolução clínica de 22 a 61h e quadro de insuficiência hepática, incluindo icterícia e sinais de EH (Bandarra et al. 2011). Em bovinos ocorreram sinais clínicos a partir de 16h após ingestão da planta, caracterizados por apatia, anorexia, sialorreia, fraqueza progressiva, coma e morte; sinais de EH foram observados entre 67 e 153h após ingestão de *T. micrantha* (Traverso et al. 2004). Na intoxicação por *T. micrantha* foi observado que o período entre a ingestão da planta e a morte dos animais é mais longo que para as demais plantas de ação hepatotóxica aguda (Traverso et al. 2002, 2003).

Exames de patologia clínica revelaram, em caprinos (Traverso et al. 2002) e bovinos (Traverso et al. 2004) experimentalmente intoxicados por *T. micrantha*, hipoglicemia e elevação da atividade sérica de gama-glutamil transferase (GGT) e, em equinos, elevação da GGT, dos níveis séricos de amônia e diminuição da glicemia (Bandarra et al. 2011).

Os achados de necropsia na intoxicação por *T. micrantha* em caprinos foram caracterizados, principalmente, por hemorragias disseminadas, mais evidentes em tecido subcutâneo e coração e alterações no fígado; que estava amarelado, friável, com evidência do padrão lobular (Traverso et al. 2002, 2003, Gava et al. 2010), alteração esta também relatada em equinos intoxicados (Bandarra et al. 2010, 2011). Em bovinos, os achados mais significativos estavam também no fígado, o qual era friável, com evidência do padrão lobular e áreas de hemorragia. Havia também petéquias em serosas e edema na parede da vesícula biliar (Traverso et al. 2004).

Como achados histológicos em animais intoxicados por *T. micrantha* são descritos necrose hepática centrolobular a massiva em caprinos (Traverso et al. 2002, Gava et al. 2010), coelhos (Traverso et al. 2000), bovinos (Traverso et al. 2004) e equinos (Bandarra et al. 2011) e vacuolização de hepatócitos, além de congestão e hemorragia (Traverso et al. 2000, 2002, 2004, Gava et al. 2010, Bandarra et al. 2011). Em equinos havia também tumefação hepatocelular e, em alguns casos, proliferação difusa e acentuada de células epiteliais de ductos biliares, infiltrado de macrófagos e corpúsculos apoptóticos. Alterações encefálicas são também descritas, caracterizadas por degeneração e necrose neuronal, edema perineuronal e perivascular em caprinos (Traverso et al. 2002, Gava et al. 2010) e em bovinos (Traverso et al. 2004); satellitose e vacuolização de substância branca (Gava et al. 2010). No encéfalo de equinos intoxicados são descritos, além de edema perivascular generalizado, astrócitos Alzheimer tipo II na substância

cinzenta (Bandarra et al. 2011). Em bovinos o exame histológico revela ainda necrose tubular renal (Traverso et al. 2004).

Recentemente, foi descrita a intoxicação natural por *T. micrantha* em ovinos (Wouters et al. 2013) nos quais observou-se quadro de pneumotoxicidade induzido pela ingestão da planta, não observado na intoxicação em outras espécies animais estudadas, intoxicadas natural ou experimentalmente. Esses achados motivaram a realização do estudo.

Este trabalho tem por objetivos estabelecer a dose tóxica e descrever os achados clínico-patológicos da intoxicação experimental por *T. micrantha* em ovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cinco ovinos mestiços Texel, machos e fêmeas, com 1 a 2 anos de idade, foram mantidos em baias, em que recebiam feno de alfafa, água potável e sal mineral próprio para ovinos, fornecidos “*ad libitum*”. Os animais foram submetidos a avaliação clínica prévia ao início do experimento, exames parasitológicos de fezes e adaptação por três semanas. Antes da administração da planta os animais foram pesados, avaliados clinicamente e submetidos a colheita de sangue para exames bioquímicos. Folhas de *T. micrantha* foram colhidas de uma mesma árvore (Fig. 1) no município de Porto Alegre e fornecidas no dia da colheita ou esta era realizada no final da tarde, as folhas mantidas refrigeradas e administradas na manhã seguinte. Os animais que não adoeceram após o consumo da primeira dose receberam nova dose 30 dias após e os que não adoeceram receberam uma terceira dose, 30 dias após a segunda. As doses foram ajustadas conforme o desfecho na administração anterior da planta. Um animal (Ovino 1), que adoeceu e se recuperou após a primeira dose, também recebeu mais duas doses, com intervalos de 30 dias. No dia do fornecimento da terceira dose de *T. micrantha* os Ovinos 1, 4 e 5 foram submetidos a biópsia hepática (percutânea com agulha às cegas) realizada conforme técnica descrita por Néspoli et al. (2010).

Os animais eram submetidos a exame clínico diário, intensificado com o aparecimento de alterações clínicas. Foram realizadas colheitas diárias de amostras de sangue com extração do soro para dosagem de gama-glutamiltransferase (GGT), bilirrubina direta e total. Os animais que não adoeceram e o que se recuperou da primeira administração foram submetidos a colheitas diárias de sangue até 15 dias após a ingestão da planta. Hemograma foi realizado nos animais que apresentaram manifestações respiratórias. Os ovinos foram testados sorologicamente para Maedi-Visna.

Três ovinos (Ovinos 1, 2 e 3) foram submetidos a eutanásia *in extremis*. Todos foram necropsiados imediatamente após a morte. Fragmentos de pulmão e fígado de três ovinos (Ovinos 1, 3 e 5) foram fixados em solução tamponada de glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2% e cacodilato de sódio, desidratados em etanol e incluídos em resina epoxy para exame de microscopia eletrônica. Cortes semifinos foram corados com azul de metileno. Cortes ultrafinos de áreas selecionadas dos blocos de resina foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Foi usado microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 kV.

Os pulmões de todos os animais que apresentaram manifestação clínica respiratória foram pesados e colhidos fragmentos para microbiologia. Foram colhidos fragmentos de diversos órgãos e de cada lobo pulmonar de todos os ovinos, acondicionados em frascos individuais e fixados em formalina tamponada 10%. Após a fixação do encéfalo foram efetuados cortes selecionados de telencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal. Após a fixação, fragmentos de todos os órgãos foram processados por método histológico de rotina e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Foi realizada a técnica histoquímica de Tricrômico de Masson para evidenciação de proliferação de tecido conjuntivo em pulmões. Técnicas de PAS e Perls foram realizadas em fragmentos de fígado de todos os casos (Prophet et al. 1992).

Fragmentos de pulmão foram submetidos a testes de imuno-histoquímica (IHQ) para evidenciação de pneumócitos tipo II (anticorpo anti-citoqueratina), de macrófagos alveolares (anti-mieloide/histiócitos) e de proliferação celular (anti-Ki-67). Detalhes dos protocolos realizados são apresentados no Quadro 1. As lâminas foram incubadas com o anticorpo em câmara úmida *overnight* a 4°C. Após a revelação as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por aproximadamente 10 segundos.

Foi realizada, em objetiva 40x, a contagem dos pneumócitos tipo II marcados em 10 alvéolos, aleatoriamente selecionados (imunomarcção anti-citoqueratina); das células epiteliais em proliferação (anti-Ki-67) em 10 bronquíolos e em 10 alvéolos; bem como a contagem dos macrófagos em 10 alvéolos para cada caso e calculadas as médias aritméticas. Dois ovinos, cujo

óbito não tinha relação com causas tóxicas, infecciosas ou neoplásicas que envolvessem o sistema respiratório foram usados como controle negativo.

## RESULTADOS

Todos os ovinos consumiram a dose fornecida de folhas de *T. micrantha*, espontaneamente. Todos os ovinos, exceto o ovino 2, apresentaram sinais clínicos respiratórios, que iniciaram 5 a 9 dias após a ingestão da planta, com agravo progressivo. O curso clínico variou de 31 a 78 horas, conforme Quadro 2.

Foram observados taquipneia, com 60 a 160 movimentos respiratórios/minuto; dispneia, incluindo respiração ruidosa, entrecortada e evidente esforço expiratório; retração ritmada das narinas, além de mucosas conjuntivais e oral cianóticas (Ovinos 1, 3, 4 e 5) e corrimento nasal mucoso discreto (Ovinos 1 e 4). O Ovino 1 apresentava também micção frequente e em pequenos volumes. Elevação da temperatura corpórea (40,7<sup>o</sup> C a 41<sup>o</sup> C) foi constatada em dois animais (Ovinos 3 e 5). O Ovino 4 tinha aumento de volume abdominal bilateral e na região parotídea ventral (Fig. 2), com crepitação à palpação. O mesmo permanecia em decúbito esternal, no entanto, levantava quando estimulado e mantinha os membros lateralmente afastados ao caminhar.

Os animais mantiveram o apetite, exceto o Ovino 1, que apresentou apetite reduzido e o Ovino 5, com anorexia no último dia do curso clínico. O Ovino 1 recuperou o apetite depois de dois dias de manifestação clínica após ingerir a primeira dose da planta, mas apresentou taquipneia por mais 48 horas, com posterior recuperação clínica completa. O Ovino 2 apresentou redução do apetite três dias após ingestão da planta, com progressão para anorexia e atonia ruminal. Permanecia a maior tempo em decúbito esternal, pressionava a cabeça contra as paredes da baia ou mantinha a cabeça baixa, apoiada no chão ou no flanco e teve fezes amolecidas poucas horas antes da morte.

Os valores séricos de GGT dos ovinos experimentalmente intoxicados são apresentados na Fig. 3. Notou-se elevação acentuada dos valores de GGT, com pico de 233,7 U/L no Ovino 2; discreta elevação durante a primeira e a terceira administração no Ovino 1 com pico de 60,2 U/L; e moderada nos Ovinos 3, 4 e 5, com picos de 162,3 , 79,3 e 123,2 U/L, respectivamente, após a terceira administração. Não houve alteração nos valores de bilirrubina total e direta, exceto no Ovino 2, que apresentou valores máximos (2,7 e 1,2 mg/dL, respetivamente) 6 dias após ingestão da planta. Todos os animais do experimento foram sorologicamente negativos para Maedi-Visna.

Na necropsia dos quatro ovinos que apresentaram sinais clínicos respiratórios (Ovinos 1, 3, 4 e 5) foram observados estado corporal regular (Ovinos 1 e 3) ou bom (Ovinos 4 e 5), mucosas conjuntivais e oral discreta (Ovinos 3 e 5) a acentuadamente (Ovinos 1 e 4) cianóticas. No tecido subcutâneo de dois animais (Ovinos 4 e 5) havia enfisema na região cervical ventral (região parotídea). A cavidade torácica apresentava acúmulo de ar discreto (Ovino 3), moderado (Ovino 4) ou acentuado (Ovino 5) na porção mediastinal dorsal, estendendo-se por todo o mediastino e também na região periférica ao saco pericárdico em um animal (Ovino 5). Os pulmões estavam volumosos, não colabados, com impressão das costelas na superfície, pesados e com aspecto cárneo ao corte (Fig. 4) nos quatro ovinos e havia conteúdo espumoso vermelho em brônquios (Ovinos 4 e 5), além de múltiplas petéquias subpleurais. Na traqueia havia pequena quantidade de material mucoso no terço cranial (Ovino 1), mucosa intensamente avermelhada (Ovino 4), conteúdo espumoso vermelho-escuro em toda a extensão (Ovino 4) ou restrito à região da bifurcação traqueal (Ovino 5). Peso, textura e coloração dos pulmões são apresentados no Quadro 3.

Pequena quantidade de líquido citrino foi observada no saco pericárdico (Ovino 1) e, no coração (Ovino 5), foram observadas hemorragias subepicárdicas e subendocárdicas multifocais discretas. Ao exame da cavidade abdominal, um animal (Ovino 4) apresentava abundante quantidade de ar livre na cavidade e outro (Ovino 5), enfisema retroperitoneal acentuado. Dois animais (Ovinos 3 e 5) apresentaram também alteração hepática, caracterizada por evidenciação do padrão lobular, principalmente na superfície de corte, além de vesícula biliar repleta.

No animal que teve manifestação clínica de insuficiência hepática (Ovino 2) foram observados regular estado corporal, serosas e mucosas discretamente amareladas, mucosas conjuntivais e oral congestas. No fígado havia acentuada evidenciação do padrão lobular, vesícula biliar repleta e, no encéfalo, discreto achatamento das circunvoluções cerebrais.

Na avaliação histológica de quatro animais que apresentaram manifestação clínica respiratória (Ovinos 1, 3, 4 e 5) foram predominantes as alterações pulmonares (Fig. 5), com acentuado espessamento de septos alveolares por proliferação difusa de pneumócitos tipo II, evidenciados pela imunomarcção anti-citoqueratina (Fig. 5B), revestindo as paredes alveolares, o que conferia a algumas áreas um aspecto adenomatoso (Fig.6A). Muitos desses pneumócitos apresentavam núcleo

volumoso, hipercromático e nucléolos evidentes, ora bizarros e/ou multinucleados, indicando intensa proliferação celular, confirmada pela imunomarcagem anti-Ki-67 (Fig. 5C e D). Em algumas áreas havia pneumócitos descamados para a luz alveolar, ora formando sincícios. Havia também proliferação do epitélio bronquiolar, com formação de mais de uma camada celular, núcleos hipercromáticos, volumosos e redução na quantidade de cílios, mais evidente nos Ovinos 3 e 5. Discreto aumento de tecido conjuntivo foi observado nas paredes alveolares em um caso (Ovino 5), evidenciado pela coloração de Tricrômico de Masson. Havia ainda congestão difusa acentuada, edema difuso acentuado rico em proteína (Ovinos 4 e 5) ou edema difuso discreto (Ovino 3) e formação de membranas hialinas (Ovinos 3, 4 e 5) (Fig. 6B). Focos com infiltrado intra-alveolar discreto de neutrófilos foram observados, associados a fibrina (Ovino 4), ou não (Ovino 1) e havia hemorragias multifocais (Ovinos 4 e 5). Na traqueia do Ovino 4 havia congestão difusa acentuada da submucosa. Não houve diferença considerável no tipo e na intensidade das lesões entre os lobos pulmonares avaliados, em nenhum dos animais.

No fígado havia perda significativa de hepatócitos da região centrolobular (Ovinos 1, 3, 4 e 5) associada a sinusoides dilatados e repletos de sangue (Ovinos 3, 4 e 5), necrose individual e apoptose de hepatócitos (Ovino 3) e glóbulos fracamente eosinofílicos em sinusoides da região centrolobular (Ovino 4). Foram observados ocasionais hepatócitos megalocíticos em dois casos (Ovinos 1 e 4), megalocitose moderada (Ovino 5) ou mesmo acentuada (Ovino 3). Havia vacuolização hepatocelular difusa discreta em um caso (Ovino 4) ou moderada (Ovinos 1 e 5). Macrófagos com citoplasma repleto de pigmento amarelo-acastanhado granular foram observados em quantidade pequena (Ovino 1), moderada (Ovinos 3 e 4) ou acentuada (Ovino 5); esse material no citoplasma dos macrófagos foi PAS positivo e corou fracamente e de forma granular na técnica de Perls (Ovinos 3 e 5). No fígado do Ovino 3 havia ocasionais macrófagos hepáticos com citoplasma repleto de restos celulares e/ou hemácias (predominantemente em região centrolobular e ocasionais neutrófilos além de apresentar, na região portal, discreta proliferação do epitélio ductal. No fígado do Ovino 1 havia células mesenquimais de núcleo denso e fusiforme, com morfologia sugestiva de células de Ito, com vacúolo bem definido no citoplasma.

No exame histológico do Ovino 2, cujos achados de necropsia eram predominantes no fígado, foram observadas necrose e hemorragia acentuadas centrolobulares a massivas; vacuolização moderada do citoplasma de hepatócitos em área periférica à necrose, além de necrose individual de hepatócitos nesta área. Havia discreta a moderada proliferação do epitélio de ductos biliares, alguns com formação inicial de luz, além de pequena quantidade de neutrófilos, predominantemente em região portal; e alguns macrófagos e células mesenquimais fusiformes a estelares em áreas de necrose e adjacências. Hepatócitos aleatórios apresentavam núcleos volumosos e cromatina esparsa e outros, também ocasionais, tinham pseudoinclusões. No encéfalo desse animal foram observados astrócitos com núcleos amplos e vesiculares em agrupamentos de uma, duas ou três células (astrócitos Alzheimer tipo II) na substância cinzenta do córtex telencefálico frontal, no tálamo, no mesencéfalo (colículo caudal), no óbex, no cerebelo e nos pedúnculos cerebelares. Havia edema na periferia de pericário neuronal na substância cinzenta do córtex telencefálico frontal e edema perivascular, inclusive com material amorfo eosinofílico, tanto na substância cinzenta quanto na branca de telencefalo e tálamo, porém mais acentuado no córtex telencefálico. Na medula espinhal havia astrócitos com núcleo volumoso, vesicular ou não, na substância cinzenta em intumescência cervical, segmentos cervical, torácico e lombar, além de edema perivascular com material protéico no segmento cervical. Nos rins havia vacuolização moderada do citoplasma do epitélio tubular na junção corticomedular. Nos pulmões desse animal não havia alterações histológicas.

Os achados histológicos das biópsias hepáticas revelaram perda de hepatócitos da região centrolobular com dilatação sinusoidal (Ovinos 3 e 5), ocasional necrose individual de hepatócitos com discreto infiltrado inflamatório misto (Ovino 5) e pequena (Ovino 1) a moderada (Ovinos 3 e 5) quantidade de macrófagos carregados de pigmento amarelo-acastanhado na região centrolobular.

Na técnica de IHQ anti-MAC 387, houve marcação de macrófagos pulmonares, com padrão e intensidade semelhantes entre animais experimentais e controles.

Os valores encontrados nas contagens de pneumócitos tipo II (imunomarcagem anti-citoqueratina) e das células epiteliais em proliferação em alvéolos e bronquíolos (anti-Ki-67) são apresentados no Quadro 4.

Os achados dos exames em microscopia eletrônica nos pulmões dos animais avaliados foram semelhantes e consistiam de pneumócitos do tipo I com citoplasma fragmentado, ou sua ausência mantendo, contudo, a lâmina basal intacta. Os pneumócitos do tipo II recobriam extensas áreas de

superfície alveolar e apresentavam vesículas de secreção com conteúdo escasso ou totalmente ausente, além de proliferação de fibras colágenas e elastina, formando uma barreira entre a luz alveolar e os capilares (Fig. 6). No fígado foram observados em algumas áreas vários hepatócitos com aumento das cisternas do retículo endoplasmático liso. Em outras áreas, alguns hepatócitos mostravam áreas delimitadas com aumento das cisternas do retículo endoplasmático liso. Entre algumas das cisternas observaram-se filamentos curtos eletrodensos, além de acentuada tumefação mitocondrial com severa atrofia e ou destruição das cristas. Na matriz mitocondrial havia conteúdo finamente granular e siderossomos distribuídos pelo citoplasma.

Não foram cultivados agentes bacterianos patogênicos nas amostras pulmonares dos ovinos experimentalmente intoxicados. Os valores hematológicos estavam dentro dos padrões para a espécie.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Dois casos de intoxicação espontânea por *Trema micrantha* foram diagnosticados em ovinos no Rio Grande do Sul, um deles com quadro clinicopatológico caracterizado por insuficiência hepática com necrose hepatocelular acentuada; o outro por alterações respiratórias graves (Wouters et al. 2013), o que motivou a realização da intoxicação experimental em ovinos.

Mudanças na forma de criar ovinos foram sugeridas como fator predisponente para a intoxicação por plantas na espécie. A ovinocultura, atividade rural tradicional no Rio Grande do Sul, antes exercida em grandes extensões de campo nativo com baixas lotações/hectare e alimentação exclusiva em campo nativo passou a ser exercida também em criações pequenas, com maior densidade animal/área e em regiões sem tradição na criação de ovinos, onde podem ser encontradas espécies vegetais potencialmente tóxicas para a espécie (Wouters et al. 2013), justificando a necessidade de caracterização clinicopatológica da intoxicação por *T. micrantha* em ovinos.

A dose tóxica de *T. micrantha* para ovinos variou de 20 a 50 g/kg de peso vivo. A ingestão de 20 g/kg resultou em doença clínica com recuperação posterior; e a menor dose que levou à morte foi de 25 g/kg, com alterações relacionadas a insuficiência hepática.

A intoxicação por *T. micrantha* em caprinos (Traverso et al. 2002, 2003, 2005, Gava et al. 2010), equinos (Bandarra et al. 2010, 2011), bovinos (Traverso et al. 2004) e coelhos (Traverso et al. 2000) é caracterizada por insuficiência hepática aguda, com necrose hepatocelular acentuada. Somente em ovinos foi observado quadro clinicopatológico relacionado a alterações pulmonares, observadas em caso natural (Wouters et al. 2013) e reproduzidas experimentalmente, caracterizado por pneumopatia grave e por um quadro semelhante à síndrome da angústia respiratória aguda (SARA); o achado considerado mais importante da intoxicação por *T. micrantha* em ovinos. SARA é uma condição clinicamente definida por início agudo, com hipoxemia grave e dano alveolar difuso além de edema rico em proteínas e formação de membranas hialinas (Caswell & Williams 2007, López 2012).

No caso de *T. micrantha*, o princípio ativo ainda não está determinado (Matos et al. 2011), no entanto, *T. tomentosa*, uma árvore semelhante, nativa da Austrália, tem como princípio ativo um glicosídeo denominado trematoxina. A intoxicação por *T. tomentosa* induz necrose hepatocelular aguda em diferentes espécies animais (Oelrichs 1968).

A intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos (AP), presentes em diferentes espécies de plantas, incluindo as crotalárias, cujo efeito mais conhecido está relacionado a hepatotoxicidade crônica, pode também induzir lesões pulmonares em diferentes espécies, como suínos (Torres et al. 1997) e equinos (Nobre et al. 2004, Botha et al. 2012). *Crotalaria retusa* induz hepatopatia tóxica aguda em ovinos, com alterações pulmonares inespecíficas (Nobre et al. 2005).

Alterações pulmonares são relacionadas a várias substâncias pneumotóxicas, como ingestão de batatas-doces (*Ipomoea batatas*) mofadas contaminadas por *Fusarium solani* em bovinos (Figuera et al. 2003), banhos por imersão em ovinos em soluções contendo cresóis, provavelmente por absorção cutânea do produto (Linklater et al. 1982). Na África do Sul há descrição de alterações hepáticas agudas e pulmonares em ovinos relacionada à intoxicação pela planta *Hetria pallens* (Kellerman et al. 2005).

A doença com morte de ovinos por alterações pulmonares ocorreu apenas após a terceira dose da planta, com aumento progressivo da mesma até atingir 35 a 50 g/kg. Isso sugere que o aumento progressivo da quantidade de planta ingerida induza resistência parcial à intoxicação. Essa característica é observada em diferentes intoxicações e pode ser explicada por metabolização do princípio ativo pela microbiota ruminal e/ou por detoxificação hepática do mesmo por proliferação

do retículo endoplasmático liso (Cullen & Brown 2012). Foram observados hepatócitos com aumento das cisternas do retículo endoplasmático liso nos ovinos experimentalmente intoxicados por *T. micrantha*, indicando processo de adaptação celular frente à agressão.

A patogenia da lesão pulmonar induzida pela intoxicação por *T. micrantha* provavelmente está relacionada à geração de metabólito(s) intermediário(s) que provoca(m) dano ao epitélio alveolar e bronquiolar e, conseqüentemente, perda da integridade da barreira hematoaérea. Em bovinos, edema e enfisema pulmonar agudo são associados à ingestão de pastagens suculentas ricas em L-triptofano, com produção de 3-metil-indol no rúmen, absorvido e então convertido em produto intermediário eletrofílico altamente pneumotóxico por oxidases de função mista, nas células epiteliais bronquiolares (células de Clara), resultando em peroxidação lipídica e dano a membranas de células bronquiolares e pneumócitos tipo I (Caswell & Williams 2007, López 2012).

As alterações pulmonares observadas nos casos de intoxicação por *T. micrantha* em ovinos, tanto natural (Wouters et al. 2013) quanto experimentais foram caracterizadas por pneumopatia grave com dano alveolar difuso, indicando injúria de pneumócitos tipo I, aumento de permeabilidade vascular, formação de membranas hialinas e proliferação de pneumócitos tipo II. Esta foi evidenciada pela marcação imuno-histoquímica anti-citoqueratina. Como os pneumócitos tipo II, quando avulsos, são indistinguíveis, na coloração de rotina, de macrófagos alveolares (Caswell & Williams 2007), foi realizada a técnica de IHQ anti-histiócitos (MAC387) para evidenciar os macrófagos alveolares. Como não houve diferença no número de células marcadas em relação aos pulmões dos animais controle, foi excluído o aumento na quantidade de macrófagos. Adicionalmente foi observada proliferação de epitélio bronquiolar, caracterizada por múltiplas camadas de células na mucosa bronquiolar e concomitante redução na quantidade de cílios, proliferação essa confirmada pela imunomarcagem pelo anticorpo anti-Ki-67. A proteína Ki-67 é expressa nas fases ativas do ciclo celular, com marcação de células em proliferação. A reparação do dano bronquiolar agudo é seguida de esfoliação das células epiteliais para a luz bronquiolar, fagocitose e repopulação por células indiferenciadas e, após vários dias, há diferenciação em células bronquiolares ciliadas normais (López 2012). Proliferação de células não ciliadas (Clara) em bronquíolos terminais foi um achado importante em um surto de intoxicação natural por espécies de *Crotalaria* em equinos (Botha et al 2012). Hiperplasia epitelial de pequenos brônquios e bronquíolos é observado na intoxicação por *H. pallens* em ovinos (Kellerman et al. 2005).

A atividade sérica normal da enzima GGT na espécie ovina varia de 20 a 52 U/L e os teores séricos de bilirrubina total e direta variam de 0,1 a 0,5 mg/dL e 0 a 0,27 mg/dL, respectivamente (Radostits et al. 2007). A atividade sérica de GGT dos ovinos experimentalmente intoxicados manteve-se dentro dos padrões de referência nos períodos relacionados à primeira e à segunda administrações, com exceção do Ovino 2, que morreu em decorrência de lesão hepática, apresentou elevação acentuada tanto da GGT, quanto das bilirrubinas e do Ovino 1, que apresentou elevação discreta da GGT no período da primeira administração. Já no período da terceira administração, em que todos os animais morreram ou foram eutanasiados devido a alterações pulmonares, os mesmos apresentaram elevação discreta ou moderada nos valores da GGT, sendo as elevações mais evidentes nos Ovinos 3 e 5, coincidentemente, os animais em que foram evidenciadas alterações hepáticas na necropsia, no entanto não graves o suficiente para induzir manifestações clínicas de insuficiência hepática. Esta observação indica que dosagens séricas de GGT são úteis para identificar dano hepático, mesmo em casos subclínicos.

Dos cinco ovinos experimentalmente intoxicados, quatro apresentaram doença e morte provocadas pelas alterações pulmonares e um apresentou quadro clinicopatológico relacionado à necrose hepatocelular aguda, característica da intoxicação em outras espécies animais, sem manifestação de alterações respiratórias específicas. A diferença na apresentação da doença nos ovinos desse estudo, provavelmente, está relacionada principalmente à espécie animal, além da dose de planta ingerida e à suscetibilidade individual.

Enfisema de intensidade variada, observado nas regiões mediastínica, subcutânea ou retroperitoneal, pode ter resultado do aumento anormal da pressão intra-alveolar, causado pelos esforços expiratórios aumentados e pela alteração da permeabilidade entre o espaço aéreo e o interstício. Segundo Caswell & Williams (2007), o ar pode se estender ao longo dos planos faciais do mediastino e do tecido subcutâneo. O exame ultraestrutural do pulmão dos animais intoxicados demonstrou uma barreira entre a luz alveolar e os capilares, com resultantes alterações significativas nas trocas gasosas.

O período entre a ingestão da planta e a morte foi consideravelmente mais curto no animal que apresentou quadro clinicopatológico determinado por alterações hepáticas (3 dias) em comparação

com os ovinos que apresentaram alterações clínicas e morte por comprometimento pulmonar (8 a 10 dias).

Os valores hematológicos e do fibrinogênio dos animais experimentalmente intoxicados estavam dentro dos valores de referência para a espécie. Alterações no exame hematológico podem indicar se há infecção viral ou bacteriana; valores elevados em leucograma e concentrações de fibrinogênio sérico são indicativos de quadros infecciosos (Radostits et al. 2007).

Nos exames microbiológicos realizados com as amostras pulmonares dos ovinos intoxicados não foram cultivados agentes bacterianos patogênicos. Pneumonias bacterianas primárias, como pasteurelose pneumônica, ou secundárias a doenças virais como infecção por vírus Parainfluenza-3 podem provocar manifestações clínicas de insuficiência respiratória (Radostits et al. 2007). Adenomatose pulmonar e Maedi-Visna são doenças virais que cursam com alterações respiratórias em ovinos (Driemeier et al. 1998, Moojen & Riet-Correa 2007), no entanto caracterizam-se por doença crônica com insuficiência respiratória progressiva, diferente do quadro agudo apresentado pelos animais intoxicados por *T. micrantha*.

Na espécie ovina, o quadro clinicopatológico da intoxicação por *T. micrantha* é predominantemente caracterizado por alterações respiratórias. Portanto devendo a intoxicação deve ser considerada como possibilidade diagnóstica em casos de doença do sistema respiratório de ovinos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandarra P.M., Bezerra Júnior P.S., Oliveira L.G.S., Correa G.L.F., Borba M.R., Reck Júnior J., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Cannabaceae) em equinos. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11):991-996.
- Bandarra P.M., Pavarini S.P., Raymundo D.L., Corrêa A.M.R., Pedroso P.M.O. & Driemeier D. 2010. *Trema micrantha* toxicity in horses in Brazil. *Eq. Vet. J.* 42:456-459.
- Botha C. J., Lewis A, Plessis E.C., Clift S. J., Williams M.C. 2012. Crotalariaiosis equorum (“jaagsiekte”) in horses in southern Mozambique, a rare form of pyrrolizidine alkaloid poisoning. *J Vet Diagn Invest* 24:1099-1104.
- Caswell J.L. & Williams K.J. 2007. Respiratory system. p. 523-653. In: Maxie M.G. (ed). *Jubb, Kennedy and Palmer’s Pathology of Domestic Animals*. Vol. 2. 5<sup>th</sup> Ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 771p.
- Cullen J.M. & Brown D.L. 2012. Hepatobiliary system and exocrine pancreas, p.405-457. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Mosby, St. Louis. 1322p.
- Driemeier D., Moojen V., Faccini G.S. & Oliveira R.T. 1998. Adenomatose pulmonar (“Jaagsiekte”) em ovino no Rio Grande do Sul. *Cienc. Rural.* 28:147-150.
- Figuera R.A., Rozza D., Piazer J.V., Copetti M.V., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2003. Pneumonia intersticial em bovinos associada à ingestão de batata-doce (*Ipomoea batatas*) mofada. *Pesq. Vet. Bras.* 23(4):161-166.
- Gava A., Luciola J., Furlan F.H., Leal M. B. & Traverso S.D. 2010. Intoxicação por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):191-194.
- Kellerman T.S., Coetzer J.A.W., Naudé T.W. & Botha C.J. 2005. *Plant poisonings and mycotoxicosis of livestock in Southern Africa*. 2<sup>th</sup>. Ed. Oxford University Press, Cape Town. 310p.
- Linklater K.A., Angus K.W., Mitchell B., Spence J.A., Rowland A.C. & Hunter A.R. 1982. Pneumonia in sheep associated with dipping in carbolic dips. *Vet. Rec.* 110:33-36.
- López A. 2012. Respiratory system, mediastinum and pleurae. p. 458-538. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Vol. 2. 5 ed. Mosby Elsevier, St Louis.



- Lorenzi H. 2008. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 1. 5. ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 384 p.
- Matos F.J., Lorenzi H., Dos Santos L.F.L., Matos M.E.O., Silva M.G.V. & Sousa M.P. 2011. Plantas tóxicas. Estudo de fitotoxicologia, química de plantas brasileiras. Plantarum, São Paulo. 247p.
- Néspoli P.B., Gheller V.A., Peixoto P.V., França T.N., Carvalho A.U., Godoy de Araújo D.K. & Malm C. 2010. Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):29-36.
- Nobre V.M.T., Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Barbosa Filho J.M. Tabosa I.M. & Vasconcelos J.S. 2005. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*, 45:347-352.
- Nobre V.M.T., Riet-Correa F., Barbosa Filho J.M., Dantas A.F.M., Tabosa I.M., Vasconcelos J.S. 2004. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Equídeos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 24(3):132-143.
- Moojen V., Riet-Correa F. 2007. Maedi-visna dos ovinos , p.174-179. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1; 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.
- Oelrichs P.B. 1968. Isolation and purification of trema toxin from *Trema aspera*. *Phytochem.* 7:1691-1693.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (eds). 1992. Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory Methods in Histotechnology. Washington DC: American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology. 274p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary Medicine*. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh. 2156p.
- 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. 246p.
- Torres M.B.A.M., Salles M.W.S., Headley S.A. & Barros C.S.L. 1997. Intoxicação experimental por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leguminosae) em suínos. *Cienc. Rural.* 27(2):307-312.
- Traverso S.D., Colodel E.D., Loretti A.P., Correa A.M. & Driemeier D. 2003. Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. *Ciência Rural.* 33(1):133-136.
- Traverso S.D., Correa A.M., Pescador C.A., Colodel E.D., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2002. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 22(4):141-147.
- 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.
- Traverso S.D. & Driemeier D. 2000. Experimental *Trema micrantha* (Ulmaceae) poisoning in rabbits. *Vet. Human Toxicol.* 42(5):301-302.
- Traverso S.D., Zlotowski P., Germer M., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2005. Spontaneous poisoning by *Trema micrantha* (Ulmaceae) in goats. *Acta Scientiae Vet.* 33(22):207-210.
- Wouters F., Wouters A.T.B., Watanabe T.T.N., Soares M.P., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2013. Pneumotoxycosis in sheep caused by *Trema micrantha* poisoning. *Vet. Pathol.* 00(0)1-4 Published online before print February 15, 2013.

### Legendas das Figuras

- Fig 1. Árvore de *Trema micrantha* em período vegetativo, Porto Alegre/RS. Em destaque ramo da planta com frutos imaturos.
- Fig 2. Intoxicação experimental por *Trema micrantha*, Ovino 5. Acentuada distensão abdominal, aumento de volume na região parotídea (seta) e membros lateralmente afastados.
- Fig 3. Intoxicação experimental por *Trema micrantha*: valores séricos de gama glutamil transferase (GGT), expressos em U/L, conforme os períodos de administração da planta.
- Fig 4. Intoxicação experimental por *Trema micrantha*, Ovino 3. (A) Pulmões vermelho-arroxeados, volumosos, não colabados, com impressão das costelas na superfície; (B) superfície de corte de A evidenciando aspecto cárneo.
- Fig 5. Intoxicação experimental por *Trema micrantha*. Alterações pulmonares microscópicas. (A) Ovino 5, espessamento de septos alveolares e da mucosa bronquiolar, H&E, Obj 20X; (B) Ovino 5 Imunomarcção anti-citoqueratina evidenciando proliferação de pneumócitos tipo II e do epitélio bronquiolar, cromógeno DAB, Obj 20X (C) Ovino 3, Imunomarcção anti- Ki67 Obj. 40X (D) Ovino controle 2 Imunomarcção anti- Ki67 Obj. 40X.
- Fig 6. Intoxicação experimental por *Trema micrantha*. Alterações pulmonares microscópicas. (A) Ovino 5, aspecto adenomatoso devido a intensa proliferação de pneumócitos tipo II, H&E, Obj 40X; (B) Ovino 4, congestão e edema difusos, formação de membranas hialinas e infiltrado intra-alveolar discreto de neutrófilos H&E, Obj 40X
- Fig 7. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* em ovinos. Microscopia eletrônica do pulmão: (A) pneumócitos do tipo II (P) recobrimo extensas áreas de superfície alveolar; asterisco indica eritrócito no capilar alveolar; (B) pneumócitos com vesículas de secreção e conteúdo escasso (seta) ou totalmente ausente, além de proliferação de fibras colágenas (setas brancas) e elastina (cabeça de seta) formando uma barreira entre a luz alveolar e os capilares.

### Quadros

**Quadro 1. Dados dos protocolos das técnicas de imuno-histoquímica empregadas na avaliação de pulmões de ovinos experimentalmente intoxicados por *Trema micrantha*.**

| Anticorpo<br>Clone   | Recuperação<br>antigênica                                      | Diluição anticorpo | Método<br>detecção                      |
|--|--|--------------------|---|
| Anti-Citoqueratina<br>Clones AE1/AE3 <sup>a</sup>            | Citrato pH 6.0 125 <sup>o</sup> C, 3min<br>panela de pressão   | 1:80               | Mach 4 <sup>c</sup><br>DAB <sup>d</sup> |
| Anti- Mieloide/<br>Histiócitos<br>Clone MAC 387 <sup>a</sup> | TRIS-EDTA pH 9.0 10min,<br>micro-ondas potência máxima         | 1:300              | Mach 4 <sup>c</sup><br>DAB              |
| Anti-Ki-67<br>Clone MIB-1 <sup>a</sup>                       | Citrato pH 6.0 125 <sup>o</sup> C, 7 min,<br>panela de pressão | 1:300              | Mach 4 <sup>c</sup><br>DAB              |

<sup>a</sup> Anticorpo monoclonal anti-humano (Dako), produzido em camundongo

<sup>b</sup> Protein Block Serum-Free Ready-to-use Dako Code X0909

<sup>c</sup> Kit MACH 4 Mouse Probe por 10 minutos e polímero MACH 4 HRP (Biocare Medical, LLC) por 15 minutos

<sup>d</sup> Diaminobenzidina (Dako)

**Quadro 2. Delineamento e evolução clínica da intoxicação experimental por *Trema micrantha* em ovinos.**

| Ovino | Sexo | Idade (anos) | Administração da planta | Peso (kg) | Dose (g/kg) | Tempo de ingestão da planta | Início sinais clínicos <sup>a</sup> | Evolução clínica            |
|-------|------|--------------|-------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1     | F    | 1            | 1ª. dose                | 19,2      | 20          | 1h e 30min                  | 9 dias e 9h                         | Recuperou após 4 dias       |
|       |      |              | 2ª. dose                | 20,4      | 22,5        | 1h                          | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 3ª. dose                | 20        | 35          | 13h e 45min                 | 5 dias                              | 78h. Eutanásia <sup>b</sup> |
| 2     | F    | 1            | Dose única              | 28,2      | 25          | 2h                          | 3 dias                              | 60h. Eutanásia <sup>b</sup> |
| 3     | F    | 2            | 1ª. dose                | 26        | 22,5        | 2h                          | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 2ª. dose                | 27        | 30          | 9h e 30min                  | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 3ª. dose                | 30        | 50          | 17h                         | 9 dias                              | 31h. Eutanásia <sup>b</sup> |
| 4     | M    | 1            | 1ª. dose                | 32        | 22,5        | 7h                          | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 2ª. dose                | 35,3      | 35          | 9h e 40min                  | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 3ª. dose                | 37,7      | 50          | 5h                          | 7 dias e 18h                        | 44h. Morte espontânea       |
| 5     | F    | 1            | 1ª. dose                | 32,25     | 25          | 4 h                         | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 2ª. dose                | 34        | 40          | 24h e 30min                 | -                                   | Não adoeceu                 |
|       |      |              | 3ª. dose                | 37,4      | 50          | 14h e 30min                 | 6 dias e 7h                         | 43h. Morte espontânea       |

<sup>a</sup> Após término da ingestão das folhas da planta. <sup>b</sup> Realizada *in extremis*

**Quadro 3. Características macroscópicas pulmonares de ovinos experimentalmente intoxicados por *Trema micrantha*.**

| Ovino      | Textura | Coloração            | Peso vivo kg | Peso pulmões g (%) |
|------------|---------|----------------------|--------------|--------------------|
| 1          | Cárnea  | Rósea-escuro         | 20           | 504,6 (2,52%)      |
| 2          | Normal  | Normal               | 28,2         | -                  |
| 3          | Cárnea  | Vermelha-arroxeadada | 30           | 572 (1,91%)        |
| 4          | Cárnea  | Vermelha-escuro      | 37,7         | 1.038 (2,75%)      |
| 5          | Cárnea  | Vermelha-escuro      | 37,4         | 736 (1,97%)        |
| Controle 1 | Normal  | Normal               | 47,5         | 397 (0,83%)        |
| Controle 2 | Normal  | Normal               | 36           | 363 (1,01%)        |

**Quadro 4. Quantificação\* das células marcadas em pulmões de ovinos experimentalmente intoxicados por *Trema micrantha* usando imunomarcção anti-citoqueratina (anti-CK B) e de proliferação celular (anti-Ki-67).**

| Ovino      | Anti-CK B alvéolos | Anti-Ki-67 alvéolos | Anti-Ki-67 bronquíolos | Anti-histiócitos (MAC 387) |
|------------|--------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|
| 1          | 8,6                | 3,6                 | 6,1                    | 0,3                        |
| 2          | 1,2                | 0,4                 | 0,1                    | 0,3                        |
| 3          | 10,8               | 3,1                 | 15,5                   | 0,3                        |
| 4          | 7,0                | 3,0                 | 2,7                    | 0,4                        |
| 5          | 10,4               | 4,0                 | 7,0                    | 0,2                        |
| Controle 1 | 1,4                | 0,3                 | 0,1                    | 0,3                        |
| Controle 2 | 0,4                | 0,0                 | 0,6                    | 0,3                        |

\* Valores médios obtidos a partir da contagem das células marcadas em 10 estruturas (alvéolos ou bronquíolos) aleatórias.

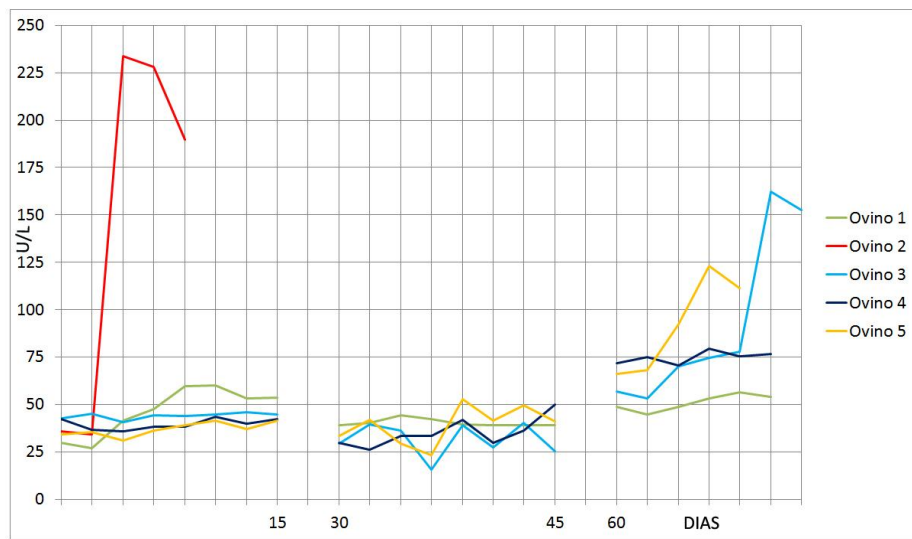
Figuras



Fig 1.



Fig 2.



As interrupções nas curvas (dias 15 a 30 e 45 a 60) referem-se aos períodos em que a coleta de sangue foi suspensa.

Fig 3.

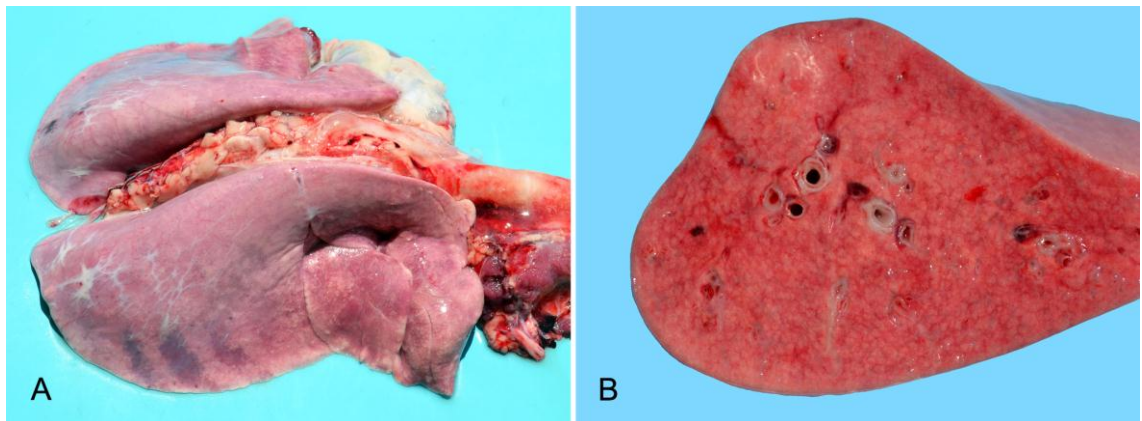


Fig 4.

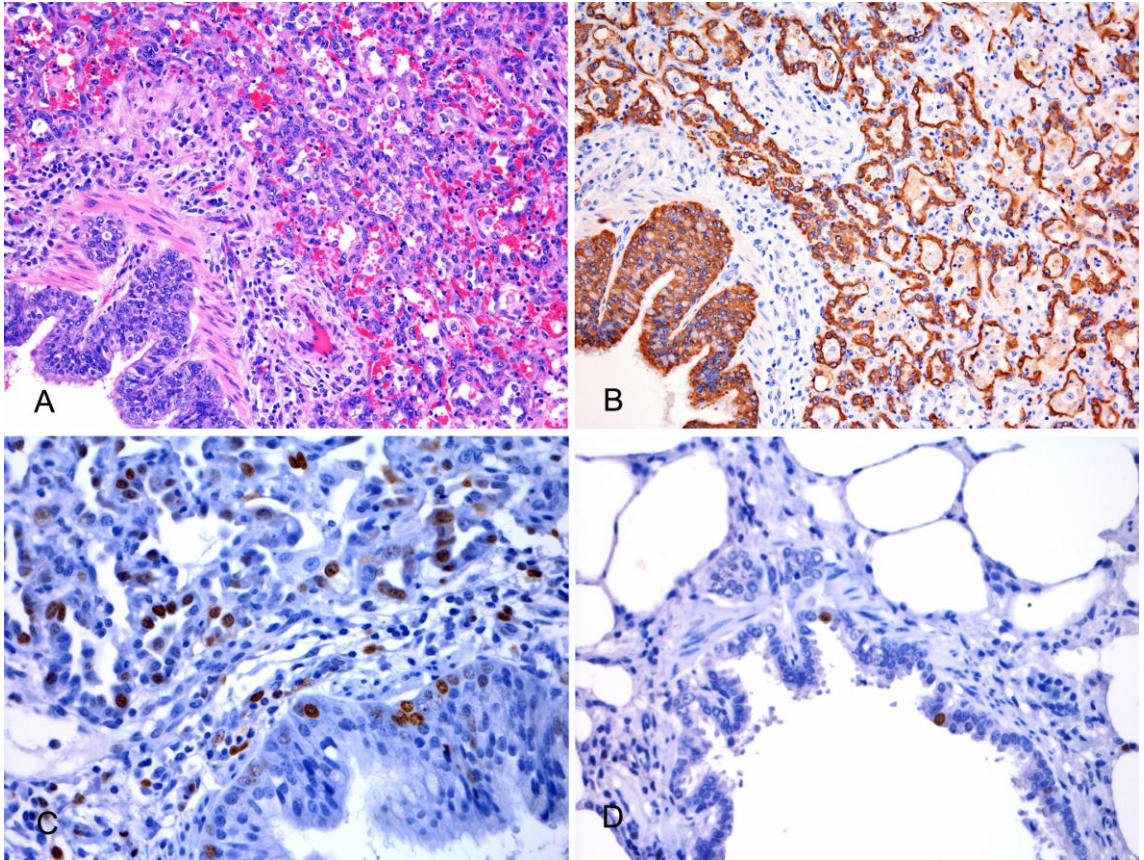


Fig 5.

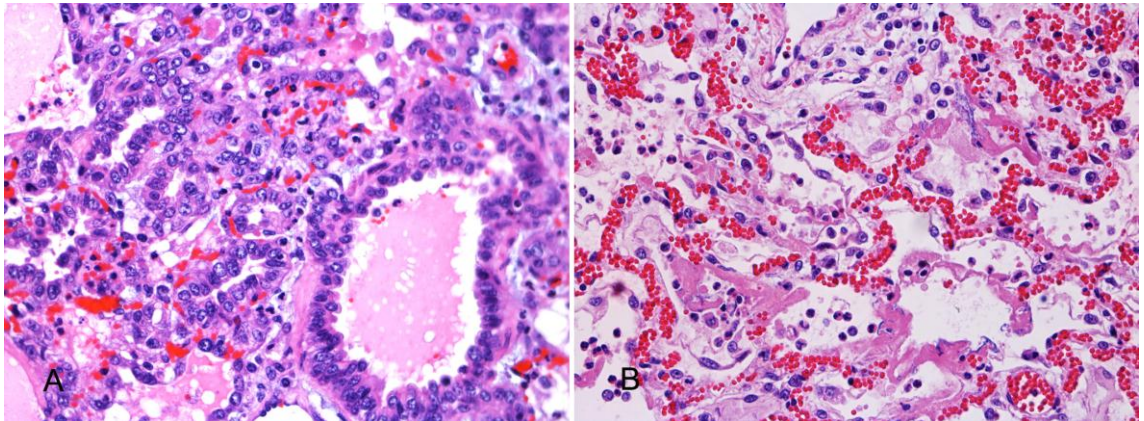


Fig 6

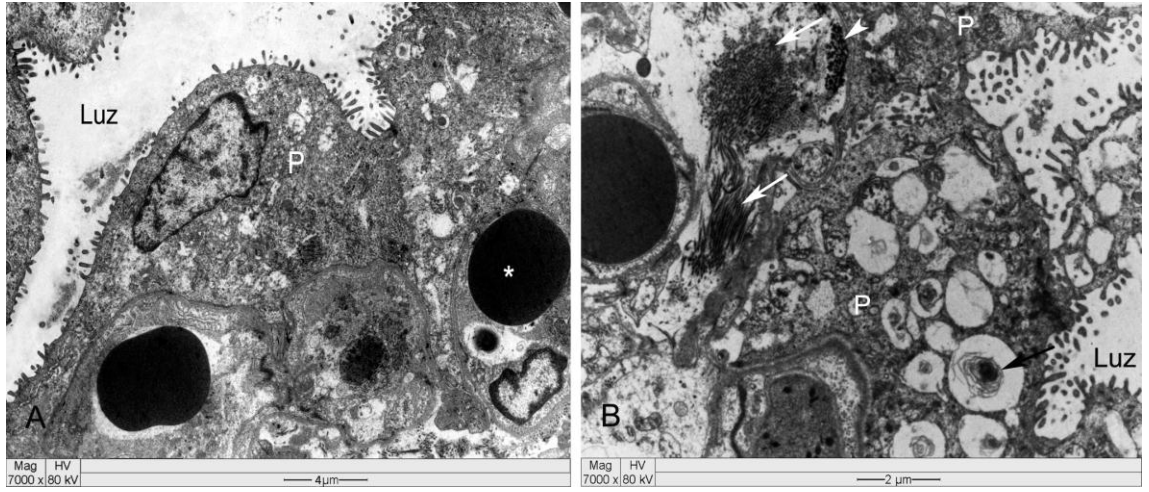


Fig 7.

#### 4. CONCLUSÕES

A dose tóxica de *Trema. micrantha* para ovinos variou de 20 a 50 g/kg de peso vivo. A ingestão de 20 g/kg resultou em doença clínica com recuperação posterior; e a menor dose que levou à morte foi de 25 g/kg, com alterações clinicopatológicas de insuficiência hepática aguda.

Na espécie ovina o quadro clinicopatológico da intoxicação por *T. micrantha* é caracterizado predominantemente por alterações respiratórias.

A intoxicação por *T. micrantha* deve ser considerada como possibilidade diagnóstica em casos de doença do sistema respiratório de ovinos.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDARRA, P.M.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; OLIVEIRA, L.G.S.; CORREA, G.L.F.; BORBA, M.R.; RECK JÚNIOR, J.; CRUZ, <sup>1</sup> C.E.F.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Cannabaceae) em eqüinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.11, 2011.
- BANDARRA P.M., PAVARINI S.P., RAYMUNDO D.L., CORRÊA A.M.R., PEDROSO P.M.O & DRIEMEIER D. *Trema micrantha* toxicity in horses in Brazil. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 456-459. 2010.
- GAVA, A., LUCIOLI, J., FURLAN, FH, LEAL, M. B., TRAVERSO, S. D. Intoxicação por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 191-194, 2010.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. v. 1. 384 p.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos Montevideo: Hemisferio Sur, 1993.
- TRAVERSO, S.D., COLODEL, E.D., LORETTI, A.P., CORREA, A.M. & DRIEMEIER, D.. Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n. 1, p. 133-136, 2003.
- TRAVERSO, S.D., ZLOTOWSKI P., GERMER, M., CRUZ, C.E.F. & DRIEMEIER, D.. Spontaneous poisoning by *Trema micrantha* (Ulmaceae) in goats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33. n. 22, p. 207-210, 2005.