

INTOXICAÇÃO POR *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*: EVOLUÇÃO E REVERSIBILIDADE DAS LESÕES EM BOVINOS, E SUSCETIBILIDADE DE OVINOS, COELHOS, CÓBAIOS E RATOS¹

MARCIA DOS SANTOS ZAMBRANO², FRANKLIN RIET-CORREA², ANA LUCIA SCHILD^{2,3}
E MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ^{2,3}

ABSTRACT.- Zambrano M.S., Riet-Correa F., Schild A.L. & Méndez M.C. 1985. [Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*: evolution and reversibility of the lesions in cattle and susceptibility of sheep, rabbits, guinea pigs and rats.] Intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*: evolução e reversibilidade das lesões em bovinos, e suscetibilidade de ovinos, coelhos, cobaias e ratos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 5(4): 133-141. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., Univ. Fed. de Pelotas, 96100 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

The evolution of lesions caused by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* in the central nervous system of cattle was studied experimentally in 7 calves. The doses used varied from 75 to 1,163 g/kg of body weight, administered in periods from 15 to 620 days. Initial alterations were characterized by vacuolation of Purkinje cells and the presence of axonal spheroids in the cerebellar granular layer. Later there was a loss of Purkinje cells which were replaced by astroglia. Axonal spheroids suffered wallerian degeneration and, as a consequence microcavitation and proliferation of astroglia were observed. Simultaneously with the degenerative process, perivascular cuffing, consisting mainly of macrophages, was observed. The reversibility of the lesions was studied in four calves, two of which received 440 g/kg of body weight while the other two received 350 g/kg. One of the animals which received 440 g/kg during 140 days and another which received 350 g/kg during 107 days were slaughtered at the end of plant administration. The remaining two animals were maintained without the plant for an additional 113 and 63 days, respectively, and then slaughtered.

This study showed that lesions in the pericaryon and axons of Purkinje cells, are slowly reversible, and that some spheroids probably originating from the lost Purkinje cells, suffer wallerian degeneration. The lesions observed, as well as their evolution, are similar to those described in storage diseases. The fact that these alterations are slowly reversible points to the possibility that the disease occurs as a consequence of an enzymatic inhibition or from the presence of a slowly hydrolyzed substance in the plant. In order to study the susceptibility to the intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*, three sheep were fed 430 g/kg of body weight in a period of 202 to 370 days, while six rabbits, six guinea pigs and eight rats received 10% of the plant in a commercial feed during 120 days. Of all species tested, only sheep were susceptible to the intoxication showing lesions similar to those observed in calves.

INDEX TERMS: Toxic plants, Solanaceae, *Solanum fastigiatum*, cattle, sheep, rabbits, guinea pigs, rats, cerebellar degeneration, wallerian degeneration, storage diseases, induced lipidosis.

SINOPSE.- Foi estudada a evolução das lesões do sistema nervoso central causadas por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* em 7 bovinos. Utilizaram-se doses que variaram de 75 g/kg de peso a 1.163 g/kg de peso administradas num período entre 15 e 620 dias. As alterações iniciais caracterizaram-se por vacuolização das células de Purkinje e presença de esferóides axo-

nais localizados na substância branca cerebelar. Posteriormente, ocorreu o desaparecimento de células de Purkinje, sendo substituídas por astroglia. Os esferóides axonais sofreram degeneração walleriana, observando-se, em consequência, microcavitações e proliferação de astroglia. Simultaneamente ao processo degenerativo, observou-se acúmulo perivascular constituído principalmente por macrófagos. A reversibilidade das lesões foi estudada em 4 bovinos, dois dos quais receberam 440 g/kg de peso, os outros dois, 350 g/kg de peso. Um dos bovinos que receberam 440 g/kg de peso durante 140 dias e outro que recebeu 350 g/kg durante 107 dias, foram sacrificados após o final da administração da planta, e os outros dois animais foram mantidos sem a planta por 113 e 63 dias, respectivamente, e, posteriormente, sacrificados. Este estudo demonstrou que as lesões do pericário e axônios são lentamente

¹ Aceito para publicação em 7 de junho de 1985.

Baseado na tese de Mestrado apresentada pelo primeiro autor no curso de Pós-Graduação em Sanidade Animal da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Trabalho financiado pela Embrapa-UEPAE/Pelotas e o CNPq.

² Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96100 Pelotas, Rio Grande do Sul.

³ Bolsista do CNPq.

reversíveis, e alguns esferóides, pertencentes provavelmente às células de Purkinje já desaparecidas, sofrem degeneração walleriana. As lesões observadas, bem como sua evolução são similares às descritas nas doenças do armazenamento; o fato de que essas alterações sejam lentamente reversíveis indica a possibilidade de que a enfermidade ocorra em consequência de uma inibição enzimática ou da presença de uma substância lentamente hidrolisável contida na planta. Para o estudo da suscetibilidade à intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*, foram utilizados 3 ovinos que receberam 430 g/kg de peso, num período de 202 a 370 dias, e 6 coelhos, 6 cobaias e 8 ratos, que receberam planta a 10% misturada em ração comercial durante 120 dias. Das espécies utilizadas, somente os ovinos foram sensíveis à intoxicação por esta planta, mostrando lesões similares às observadas em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, Solanaceae, *Solanum fastigiatum*, bovinos, ovinos, coelhos, cobaias, ratos, degeneração cerebelar, degeneração walleriana, enfermidades do armazenamento, lipídose induzida.

INTRODUÇÃO

A intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* em bovinos caracteriza-se por sintomatologia de disfunção cerebelar, evidenciada por crises periódicas do tipo epileptiforme com transtornos de locomoção, opistótono, nistagmo, queda, ficando o animal em decúbito dorsal ou lateral e tremores musculares. Caracteriza-se microscopicamente por vacuolização citoplasmática das células de Purkinje, desaparecimento dessas células e presença de esferóides axonais na camada granulosa e substância branca do cerebelo. Essas alterações são similares às encontradas nas doenças do armazenamento no homem e nos animais. Na microscopia eletrônica observam-se corpúsculos membranosos citoplasmáticos similares aos vistos nas gangliosidoses (Riet-Correa et al. 1983).

A possibilidade de que a intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* seja uma doença do armazenamento evidencia a necessidade de estudos sobre aspectos tais como identificação da substância armazenada, evolução e reversibilidade das lesões, que permitam esclarecer a patogenia, bem como a necessidade de determinar espécies experimentais suscetíveis à intoxicação, para futuros estudos.

Os objetivos do presente trabalho foram: observar o desenvolvimento cronológico das lesões do cerebelo de bovinos; determinar a reversibilidade das lesões observando a regressão das alterações no cerebelo de bovinos; caracterizar a substância acumulada no citoplasma utilizando-se colorações especiais; determinar a suscetibilidade de ovinos, coelhos, cobaias e ratos à intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* para o uso dessas espécies de menor porte em futuros trabalhos de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

A planta *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*, utilizada para reprodução experimental da enfermidade, foi coletada em estabelecimentos onde ocorre a doença, situados em Piratini, Canguçu, Pedro Osório e Pelo-

tas, no Rio Grande do Sul. Folhas, frutos e flores foram secados à sombra, moídos e conservados a -15°C .

Foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho 7 bovinos da raça Holandês, 3 bovinos da raça Jersey, sendo todos machos com aproximadamente 1 ano de idade; 5 ovinos da raça Corriedale de aproximadamente 1 ano; 6 coelhos, 6 cobaias e 8 ratos.

Experimentos em bovinos

Para o estudo da progressão e reversibilidade das lesões, os animais utilizados foram mantidos a campo, recebendo uma suplementação de 2 kg de ração comercial para bovinos, diariamente, sendo a planta ministrada aos animais através de fístula ruminal. Semanalmente foi utilizado o HRTTest, descrito por Piennar (1976), para provocar a manifestação da sintomatologia nervosa. Esse teste consiste em erguer a cabeça do animal forçando-a para trás no sentido crânio caudal, mantendo-se essa posição durante 1 minuto, soltando-a subitamente.

Progressão das lesões. A identificação e tratamento utilizados nos animais para o estudo da progressão das lesões em bovinos constam do Quadro 1. Os animais sempre foram sacrificados no dia seguinte a finalização da administração da planta.

Reversibilidade das lesões. Peso inicial, total de planta consumida e tempo total de experimento são observados no Quadro 2. Os animais n.º 6 e 10 receberam diariamente, durante 5 dias na semana, 5 g de planta por kg de peso durante 140 dias, perfazendo um total de 440 g de planta por kg de peso, sendo que o animal n.º 6 foi sacrificado no dia seguinte à finalização da administração, e o animal n.º 10, 113 dias após. Os animais n.º 5 e 9 receberam 5 doses semanais de 5 g de planta durante 107 dias, perfazendo um total de 350 g de planta por kg de peso, sendo o animal n.º 5 sacrificado após a finalização da administração, e o n.º 9, 63 dias após.

Sacrifício dos animais e fixação do material. Os animais n.º 1, 3, 8 e 10 foram sacrificados por exanguinação realizando-se simultaneamente a perfusão do sistema nervoso central (SNC) primeiramente com solução fisiológica e posteriormente com formol tamponado a 10%, sendo os crânios mantidos em imersão com formol a 10% por 48 h, e, posteriormente, retirado o SNC e mantido em formol a 10%. O animal n.º 2 morreu em consequência de broncopneumonia, sendo retirado o SNC e fixado em formol a 10%. Os animais n.º 4, 5, 7 e 9 foram sacrificados por exanguinação, sendo retirado o SNC imediatamente após o desaparecimento dos sinais vitais e fixado por imersão em formol a 10%. O animal n.º 6 foi heparinizado e morreu durante a anestesia, sendo retirado o SNC e fixado por imersão em formol a 10%. De todos os animais, exceto o n.º 7, foram retirados, além do SNC, fragmentos de fígado, linfonodos e rins, sendo fixados por imersão em formol a 10%. O período total de experimento em cada animal desde o início da administração até o sacrifício ou morte espontânea observa-se nos Quadros 1 e 2.

Estudo histológico das lesões. Para o estudo histológico das lesões, foram realizados cortes transversais no SCN, abrangendo cerebelo, córtex cerebral, cápsula interna, tálamo, tubérculos quadrigêmeos, ponte e medula oblonga, sendo também cortados fígado, rins e linfonodos (com exceção do animal n.º 7). Os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados com $6\ \mu\text{m}$ e corados em hematoxilina e eosina (HE).

Para avaliar-se o desaparecimento das células de Purkinje, foi feito um estudo morfológico, efetuando-se a contagem dessas células com um aumento de 200 vezes num total de 300 campos por animal, analisando-se os dados através de uma regressão linear logarítmica.

A avaliação da quantidade de esferóides foi feita também por morfometria, mediante a contagem dessas estruturas em 40 campos por animal, com aumento de 300 vezes na substância branca cerebelar e núcleos cerebelosos.

Para a identificação histoquímica da substância acumulada no interior das células de Purkinje, foram utilizadas colorações pelas técnicas de PAS, Sudan Black, Sudan III, ácido ósmico, Azul de Toluidina e Carmin de Best em cortes de $15\ \mu\text{m}$ com micrótomo de congelação, e, em cortes de $6\ \mu\text{m}$ na parafina, de PAS, Sudan III, Azul de Toluidina e Carmin de Best. Para o estudo da mielina dos axônios degenerados, utilizou-se a técnica de Cajal-Ranson em cortes de parafina com $6\ \mu\text{m}$.

Experimentos em ovinos

Cinco ovinos foram mantidos em baias separadas, sendo três escolhidos ao acaso, identificados como B₃, B₄, B₅ e dois testemunhas, como B₁ e B₂.

Os animais tratados receberam cada um 1 kg de ração com 20% de *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* diariamente durante 53 dias, e, após, foi oferecido a cada animal 200 g de planta pura 3 vezes por semana, sendo controlada a quantidade de planta ingerida, mediante a pesagem do excedente a cada dia de administração, até perfazer o total de 430 g de planta ingerida, por quilo de peso vivo e por animal, num período de 202 à 370 dias.

Sacrifício dos animais e fixação do material. Quatro animais que foram sacrificados no dia seguinte à finalização da administração da planta, foram perfundidos e sacrificados em forma similar aos bovinos, e posteriormente o SNC foi mantido em formol a 10%. De todos os animais foram coletados fígado, rins e linfonodos, sendo fixados em formol a 10%. O animal B₃ foi encontrado morto, e o SNC foi fixado da mesma maneira.

Estudo histológico das lesões. Nos ovinos pesquisaram-se lesões similares às encontradas em bovinos, no cerebelo, e outras áreas do SNC (córtex cerebral, cápsula interna, tálamo, tubérculos quadrigêmeos, ponte e medula oblonga), bem como rins, fígado e linfonodos, em cortes de parafina com 6 µm corados pela técnica de HE.

Experimentos em coelhos, cobaias e ratos

Seis coelhos, 6 cobaias e 8 ratos receberam planta misturada a 10% em ração comercial para coelhos, durante 120 dias, mantendo-se dois animais de cada espécie como testemunhas.

Sacrifício dos animais e fixação do material. Todos os animais foram sacrificados no dia seguinte à finalização da administração da planta. Os ratos e cobaias foram anestesiados com éter e posteriormente sacrificados por exanguinação, e os coelhos sacrificados com choque elétrico, retirando-se o SNC, rins, fígado e linfonodos, fixando-os por imersão em formol a 10%.

Estudo histológico das lesões. Fragmentos dos órgãos mencionados foram incluídos em parafina, cortados com espessura de 6 micra e corados em HE.

RESULTADOS

Experimentos em bovinos

Os animais n^o 1, 2 e 3, quando submetidos ao HRTest, não apresentaram sintomatologia clínica. O animal n^o 4 apresentou sintomas quando submetido ao HRTest aos 155 dias, e 18 dias após apresentou sinais neurológicos espontâneos, como nistagmo, incoordenação, opistótono, extensão dos membros dianteiros, tremores musculares e queda, o animal ficando em decúbito dorsal. Os animais n^o 6 e 10 apresentaram sintomas caracterizados, mediante o HRTest, por tremores musculares aos 40 dias de experimento. O animal n^o 7 não apresentou evidências de sinais clínicos em nenhuma oportunidade, mediante o HRTest. Os animais n^o 5 e 9 evidenciaram, mediante o HRTest, sinais clínicos aos 98 dias de experimento, caracterizados por queda do trem posterior, extensão dos membros dianteiros e incoordenação motora momentânea.

Progressão da lesão no cerebelo (Quadro 3)

Lesões das células de Purkinje. No animal n^o 1 (75 g/kg em 15 dias) e no animal n^o 8, testemunha, observaram-se somente núcleos picnóticos e células hiper Cromáticas, enquanto que no animal n^o 2 (117 g/kg em 24 dias), além dessas alterações en-

Quadro 1. Tratamento utilizado nos bovinos para o estudo da progressão das lesões na intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*

Número do animal	Peso inicial kg	Tempo total de experimento (dias)	Total de planta consumida	
			kg	g/kg
1(a)	110	15	8,250	75
2	75	24	8,805	117
3	100	32	16,000	160
4(b)	93	187	34,375	369
5	105	107	38,150	350
6	92	140	40,460	440
7	211	620	245,560	1163
8	104	0	0	0

(a) Os animais n^o 1, 2 e 3 receberam diariamente 5 g de planta por quilo de peso.

(b) Os animais n^o 4, 5, 6 e 7 receberam planta 5 dias na semana; o n^o 4, 3,96 g/kg; o n^o 5 e n^o 6, 5 g/kg e o n^o 7, 1,86 g/kg durante 353 dias e 3,7 g/kg durante 267 dias. O animal n^o 8 permaneceu como testemunha.

contraram-se células com discreta vacuolização citoplasmática. No animal n^o 3 (160 g/kg em 32 dias) observaram-se células com vacuolização citoplasmática caracterizada por pequenos e médios vacúolos, mais ou menos esféricos, dispersos no citoplasma celular, algumas delas com núcleo marginalizado. Outras células estavam hiper Cromáticas ou apresentavam núcleos picnóticos, sendo essas alterações encontradas em menor quantidade que no animal n^o 2. Nos animais n^o 4 (369 g/kg em 187 dias), n^o 5 (350 g/kg em 107 dias) e n^o 6 (440 g/kg em 140 dias) observou-se vacuolização citoplasmática, e, em algumas células, marginalização do núcleo, em maior número de células que nos animais anteriores (Fig. 1). No animal n^o 7 (1163 g/kg em 620 dias) essas lesões eram ainda mais marcadas e apareceram em maior número de células. Observaram-se, também, nesses quatro últimos animais, células hiper Cromáticas.

Não foi possível detectar o número exato de células vacuolizadas devido à possível confusão com artefatos decorrentes da fixação do material. Nos cortes de parafina com 6 micras e cortes de congelamento com 15 micras não foi possível evidenciar nenhuma substância armazenada no interior dos vacúolos com as técnicas especiais utilizadas.

Desaparecimento das células de Purkinje. Em consequência do processo degenerativo descrito anteriormente, algumas células de Purkinje desaparecem, sendo substituídas por células gliais (Fig. 2). Na Figura 3 observa-se o resultado da análise da variação do número de células de Purkinje em função do logaritmo de tempo de ingestão da planta.

Proliferação de células da glia no córtex cerebelar. O animal n^o 1 não apresentou proliferação de células gliais. Os animais n^o 2 e 3 apresentaram discreto aumento de células, principalmente astrócitos mesclados com macrófagos e algumas células aparentemente da microglia, na camada molecular entre as células de Purkinje. Nos animais n^o 4, 5, 6 e 7, a proliferação dessas células era mais marcada.

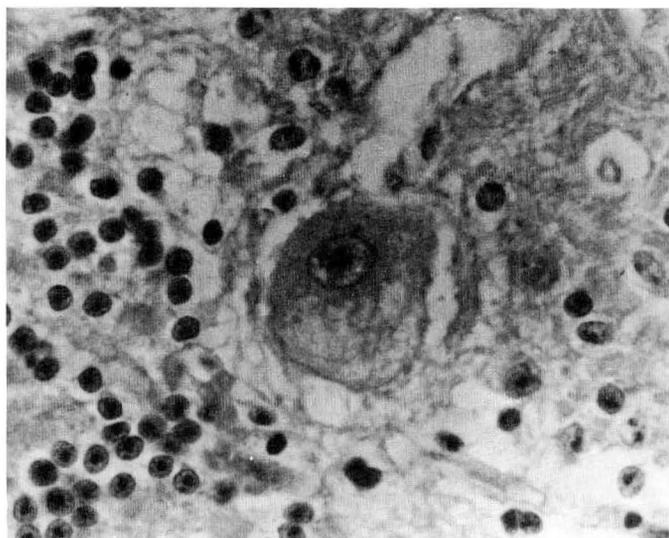


Fig. 1. Célula de Purkinje com vacuolização do pericário e marginalização do núcleo (Bov. 6). HE, obj. 40.

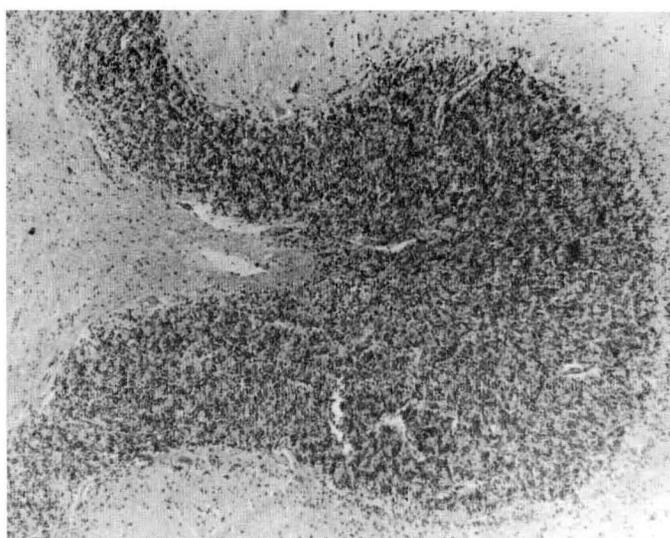


Fig. 2. Lâmina do cerebelo com ausência de células de Purkinje e proliferação de células da astrogliã (Bov. 7). HE, obj. 20.

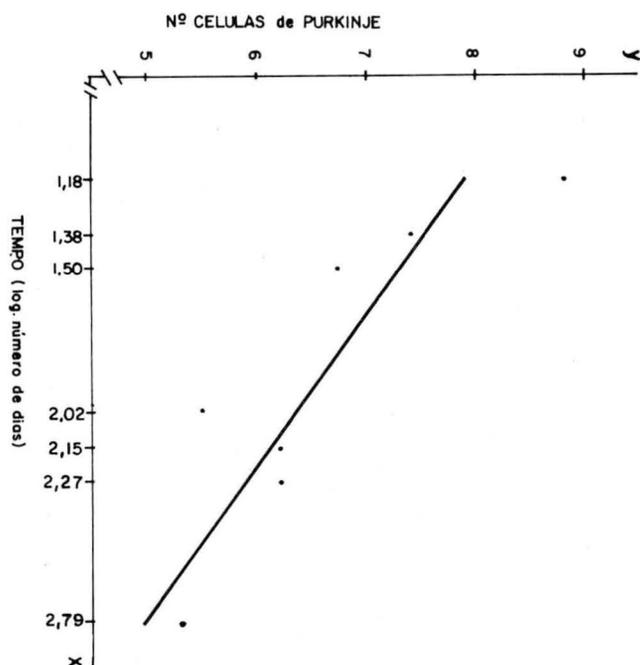


Fig. 3. Variação do número de células de Purkinje (Y) em função do logaritmo do tempo (X) de ingestão da planta. $Y = 10,04 + (-1,82.x)$, $R^2 = 0,74$ ($P < 0,05$).

Esferóides axonais, macrófagos e microcavitações. Foram observados esferóides axonais no animal nº 2, em número e tamanho reduzidos, em relação aos demais animais, nos quais observou-se um aumento gradativo em número com tamanho variável, conforme o aumento da dosagem e tempo de ingestão da planta (Fig. 4). Esses esferóides caracterizaram-se como corpos esféricos ou elípticos, sendo, na maioria, homoganeamente eosinofílicos e PAS positivos, e alguns com diversos graus de vacuolização e lise. Na coloração Cajal-Ranson, observaram-se esferóides axonais com a bainha de mielina amarela, corada homoganeamente, outros apresentaram uma linha preta uniforme ao seu redor, evidenciando o desaparecimento

de mielina, e outros com fragmentos de mielina evidenciados pela cor amarela intercalada com preto na periferia do axônio. Na substância branca cerebelar dos animais nº 3, 4, 5, 6 e 7, alguns esferóides apresentaram-se parcialmente desintegrados, apreciando-se macrófagos que apareceram como células grandes arredondadas com núcleo excêntrico, com a cromatina condensada e o citoplasma com fina granulação eosinofílica. Em outras oportunidades esses macrófagos foram observados ocupando espaços vazios (microcavitações) ou somente microcavitações sem presença de esferóides nem macrófagos (Fig. 5). As microcavitações apareceram em maior quantidade no animal nº 7, que mostrou áreas de substância branca com aspecto esponjoso. Os macrófagos no interior das microcavitações apresentavam material PAS positivo no seu citoplasma.

As médias do número de esferóides, obtidas através da contagem efetuada por animal, são observadas no Quadro 3. Esses esferóides achavam-se localizados principalmente na medula cerebelar, nos núcleos cerebelosos e, em número reduzido, na capa granulosa. Esferóides dentrícticos foram observados, também em número reduzido, na capa molecular.

Acúmulo perivascular e gliose na substância branca. Os animais nº 1 e 2 não apresentaram acúmulo perivascular nem gliose nas diversas áreas do cerebelo. O animal nº 3 apresentou discreto acúmulo perivascular e discreta gliose. Os animais nº 4, 5, 6 e 7, apresentaram severo acúmulo celular perivascular. Nesse acúmulo observaram-se dois tipos de células (Fig. 6): um, presente em maior quantidade, apresentando núcleos excêntricos grandes e arredondados, com cromatina esparsa e escasso citoplasma levemente eosinofílico, que, em algumas poucas oportunidades, encontrava-se vacuolizado com material PAS positivo no seu interior (macrófagos); o outro tipo de células, com núcleos menores, arredondados com cromatina condensada, e sem que se evidenciasse seu citoplasma. A gliose, que apareceu em forma marcada nos animais nº 4, 5 e 6, e em maior quantidade, no animal nº 7, era constituída principalmente de astrócitos mesclados com alguns macrófagos e poucas células da microglia.

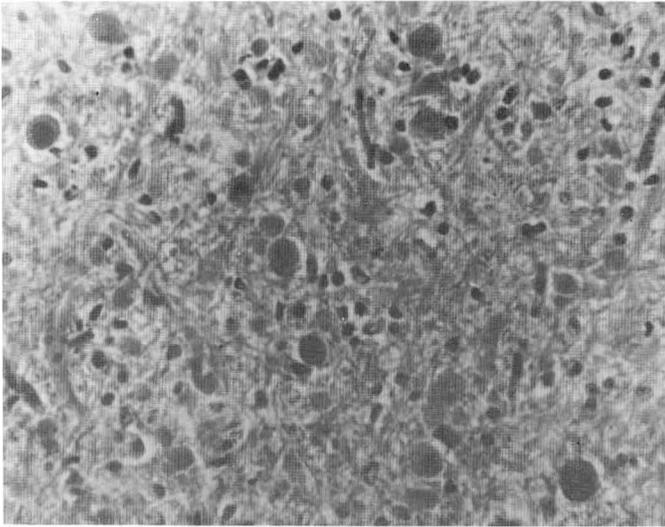


Fig. 4. Substância branca do cerebelo com presença de esferóides axonais de diferentes tamanhos (Bov. 6). HE, obj. 25.

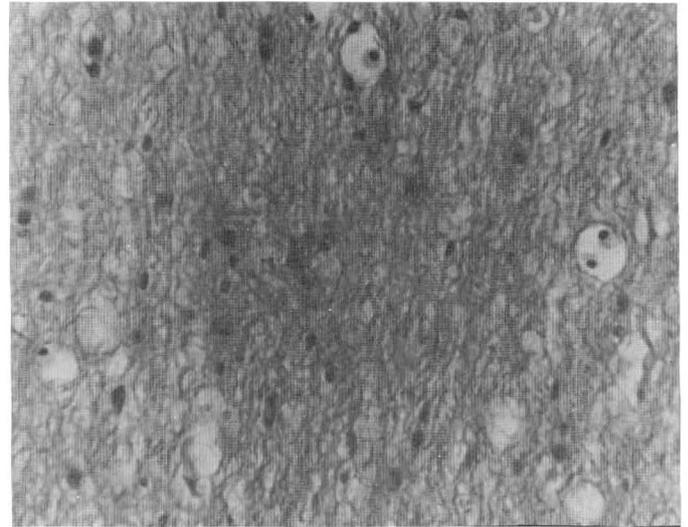


Fig. 5. Substância branca do cerebelo mostrando microcavitações, algumas com presença de macrófagos em seu interior (Bov. 7). HE, obj. 25.

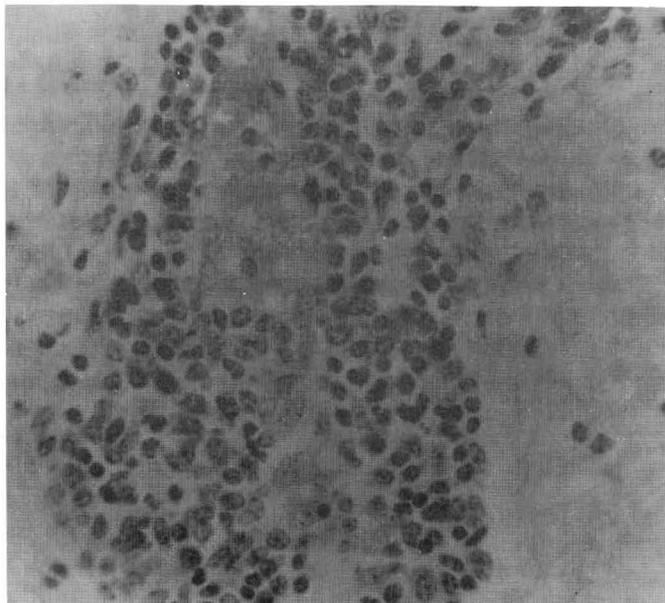


Fig. 6. Acúmulo perivascular na substância branca do cerebelo, constituído de macrófagos e outras células mononucleares (Bov. 6). HE, obj. 25.

Lesões em outras áreas do SNC

A presença e distribuição de lesões em outras áreas do SNC observam-se no Quadro 4.

Outros órgãos

Rins, fígado e linfonodos dos animais experimentais não apresentaram lesões significativas.

Reversibilidade das lesões

Os animais n^o 5 e 6 (sacrificados após completarem a dosagem de 440 g/kg e 350 g/kg de peso respectivamente) mostra-

ram vacuolização das células de Purkinje, sendo evidenciada em maior quantidade no animal n^o 6. Os animais n^o 9 e 10 (sacrificados aos 63 e 113 dias após finalizada a administração da planta) apresentaram menor número de células de Purkinje vacuolizadas, em comparação com os animais n^o 5 e 6.

As médias do número de células de Purkinje por campo dos animais n^o 6 e 10, que receberam 440 g/kg foram similares, bem como as dos animais n^o 5 e 9 que receberam 350 g/kg, são observadas no Quadro 5.

Os esferóides nos animais abatidos após atingirem a dosagem de 440 g/kg e 350 g/kg de peso (n^o 5 e 6) apareceram em número maior que nos animais sacrificados 63 e 113 dias após a suspensão de administração da planta (n^o 9 e 10). As médias do número de esferóides por campo desses quatro animais são observados no Quadro 5.

A gliose cortical apresentou-se similar nos quatro animais.

A presença de macrófagos foi constatada nos quatro animais na substância branca, e aparentemente a quantidade dessas células era similar, sendo que nos animais n^o 6 e 10 observaram-se microcavitações não evidentes nos demais animais.

O acúmulo perivascular e gliose na substância branca foram ainda mais evidentes nos animais em que a planta foi suprimida e que foram abatidos após 63 e 113 dias.

Experimentos em ovinos

Todos os ovinos, inclusive os testemunhas, apresentaram, em seguida ao HRTTest, uma discreta incoordenação motora momentânea, não sendo observados outros sintomas.

Cerebelo

Observaram-se nos três animais tratados com a dose de 430 g/kg de peso, lesões similares às dos bovinos, caracterizadas por: vacuolização citoplasmática, marginalização do núcleo, picnose e desaparecimento de células de Purkinje; esferóides axonais na medula cerebelar e núcleos cerebelosos, prolifera-

Quadro 2. Tratamento utilizado nos bovinos para o estudo da reversibilidade das lesões na intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*.

Número do animal	Peso inicial kg	Total de planta consumida		Período experimental (dias)	
		kg	g/kg	Tempo de ingestão da planta	Tempo total
6	92	40,460	440	140	140
10	95	41,775	440	140	253
5	109	38,150	350	107	107
9	102	35,700	350	107	170

Quadro 3. Progressão das lesões em cerebelo de bovinos intoxicados por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*.

Número do animal	Vacuolização de células de Purkinje	Gliose cortical	Nº esferóides axonais/campo			Macrófagos	Microcavitações	Acúmulo perivascular	Gliose	Células (b) picnóticas	Células (b) hipercromáticas
			\bar{X}	\pm	s \bar{X}						
1	-(a).	-	00,0	00,0	-	-	-	-	-	+	+
2	+	+	1,9	0,79	-	-	-	-	-	++	++
3	+	++	4,6	0,92	+	+	+	+	+	+	+
4	++	++	18,2	1,22	+	+	+++	++	++	++	++
5	++	++	20,0	1,92	++	+	++	++	++	++	++
6	+++	++	23,3	1,96	++	+	+++	+++	+++	+	+
7	+++	+++	10,6	0,53	+++	++	+++	+++	+++	++	++
8	-	-	00,0	0,00	-	-	-	-	-	+	+

(a) - Ausente, + discreta, ++ moderada, +++ acentuada.

(b) - Células de Purkinje.

Quadro 4. Distribuição das lesões em outras áreas do SNC em bovinos intoxicados por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*.

Localização das lesões	Presença de esferóides	Macrófagos	Microcavitações	Acúmulo perivascular	Gliose
Ponte	++ (3) (7) ^a + (6)	-	-	++ (4)	+ (6)
Medula oblonga	+ (4)	-	-	++ (6)	-
Tubérculos quadrigêmeos	+ (4) (6)	-	-	++ (4) (5) (6) + (2)	+ (2) (6)
Tálamo	-	-	-	+ (7) ++ (6)	-
Cápsula interna	-	-	-	++ (4)	-
Córtex cerebral	-	-	-	++ (4)	-

^a () Identificação do animal; - ausente, + discreta, ++ moderada, +++ acentuada.

ção de células gliais em áreas da camada molecular entre as células de Purkinje. Gliose e acúmulo perivascular não foram observados em nenhum dos animais. Observaram-se alguns macrófagos e microcavitações, em quantidade reduzida, nos animais B₃ e B₅.

Outras áreas do SNC

O animal B₃ apresentou macrófagos e esferóides na ponte. O animal B₄ apresentou esferóides na medula oblonga e ponte, gliose significativa nos tubérculos quadrigêmeos e tálamo.

No animal B₅ observou-se a presença de esferóides na ponte, tubérculos quadrigêmeos e tálamo. Não foi observado acúmulo perivascular em nenhum animal.

Outros órgãos

Não foram observadas alterações significativas no fígado, rins e linfonodos.

Experimentos em coelhos, cobaias e ratos

Os animais não adoeceram e não mostraram sintomas.

Quadro 5. Reversibilidade das lesões em bovinos intoxicados por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*. Média do número de células de Purkinje por campo e por animal, e média do número de esferóides por campo e por animal ($\bar{X} \pm s\bar{X}$)

Número do animal	Número de células de Purkinje/campo			Número de esferóides axonais por campo		
	\bar{X}	\pm	$s\bar{X}$	\bar{X}	\pm	$s\bar{X}$
6	6,2		0,15	23,3		1,96
10	6,5		0,16	7,4		1,02
5	5,5		0,14	20,0		1,92
9	5,4		0,13	6,4		1,02

DISCUSSÃO

As lesões observadas no SNC de bovinos intoxicados com *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*, neste experimento, caracterizaram-se por vacuolização e desaparecimento das células de Purkinje, algumas com marginalização do núcleo, proliferação de células gliais entre as células de Purkinje, esferóides axonais, macrófagos, microcavitações, acúmulo perivascular e gliose, sendo essas alterações similares às descritas por Riet-Correa et al. (1983), na intoxicação por essa planta.

A vacuolização de células do SNC e a presença de esferóides axonais são alterações semelhantes às observadas em diversas doenças do armazenamento no homem e nos animais (O'Brien et al. 1971, Leipold et al. 1979, Jones et al. 1982, Goldman et al. 1981, Kosanke et al. 1979, Walvoort 1983, Jolly & Hartley 1977, Drenckhahn & Lullmann-Rauch 1979). Baseado nessa semelhança e na presença de corpúsculos membranosos citoplasmáticos observados através da microscopia eletrônica nas células de Purkinje de animais intoxicados, Riet-Correa et al. (1983) propuseram a hipótese de que a intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* seria uma doença do armazenamento, possivelmente uma gangliosidose.

No estudo da evolução das lesões não foram observadas alterações histológicas no animal que recebeu planta durante 15 dias, enquanto que o animal que recebeu planta durante 24 dias apresentou discreta vacuolização e reduzido número de esferóides axonais, evidenciando que para o aparecimento de lesões histológicas detectáveis na microscopia óptica é necessário um período entre 15 e 24 dias, e o equivalente a doses entre 75 a 117 g de planta por kg de peso. A constatação da vacuolização das células de Purkinje e presença de esferóides axonais no animal com 24 dias de tratamento, sugere que tais lesões ocorrem simultaneamente. Para o esclarecimento desse fato seria necessário um estudo de microscopia eletrônica para detectar lesões ultra-estruturais. Considerando-se o tempo total de experimento, aos 32, 107, 187, 140 e 620 dias, foi observado um aumento gradativo do número de células vacuolizadas. A vacuolização celular e presença de esferóides no SNC são observados também nas manosidoses de origem hereditária (Jolly & Hartley 1977, Leipold et al. 1979, Jones et al. 1982) e induzida pela ingestão de *Swainsona* spp. (Laws & Auson 1968, Dorling et al. 1978, Locke et al. 1980, Huxtable & Dorling 1982), *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp. (James et al. 1970, James et al. 1981), assim como em doenças de estoca-

gem de glicogênio (Jolly & Blakemore 1973, Jolly & Hartley 1977, Matsui et al. 1983, Walvoort 1983) e nas gangliosidoses (Wolfe et al. 1970, Baker et al. 1971, Read et al. 1976, Pierce et al. 1976, Kosanke et al. 1979, Donnelly & Sheahan 1981), e na lipidose induzida por drogas (Drenckhahn & Lullmann-Rauch 1979). A semelhança das alterações observadas nas enfermidades do armazenamento acima citadas coincide com a hipótese de que a intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* induza a uma enfermidade de armazenamento.

Apesar das evidências de que a intoxicação por *S. fastigiatum* var. *fastigiatum* induza a uma doença do armazenamento, não foi possível determinar a presença de substância armazenada nas células de Purkinje, em cortes de 6 μm na parafina e cortes de 15 μm em micrótomo de congelação, mediante as técnicas de PAS, Azul de Toluidina, Sudan Black, Sudan III, ácido ósmico e Carmin de Best. Porém em cortes semifinos de material incluído em resina observaram-se grânulos densos corados com Azul de Toluidina, indicando o armazenamento de uma substância provavelmente de natureza lipídica nas células de Purkinje (Barros 1982). Goldman et al. (1981), na gangliosidose GM₁ em humanos, Kosanke et al. (1979) e Pierce et al. (1976), na gangliosidose GM₂ em suínos, utilizaram também cortes semifinos de 1 μm e coraram com Azul de Toluidina o material no interior dos vacúolos, observando pequenos corpos lipídicos no seu interior, não conseguindo corá-los em cortes de 6 μm com técnicas especiais. Esses fatos também concordam com a hipótese de que *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* induz a uma lipidose, porém não se deve descartar a possibilidade de que a substância armazenada seja outra, de origem endógena, acumulada por inibição enzimática, ou de origem exógena, acumulada por ser pouco hidrolisável. Por outro lado, Leipold et al. (1979), na manosidose hereditária, e Huxtable (1969) na intoxicação por *Swainsona*, não conseguiram evidenciar os glicídios armazenados quando utilizavam técnicas similares às empregadas neste trabalho.

O estudo realizado para constatar o desaparecimento das células de Purkinje, mediante análise de regressão linear, evidenciou que o desaparecimento das mesmas depende do tempo de ingestão da planta. Apesar da alta correlação entre o desaparecimento das células de Purkinje e log. do tempo de ingestão da planta seriam necessárias repetições em cada dosagem para melhor caracterizar essa associação. Tal necessidade de repetições é mais evidente no animal com 24 dias de experimento, que apresentou redução no número de células de Purkinje com discreta vacuolização, já que pareceria pouco provável o desapa-

recimento dessas células sem antes evidenciar lesões características.

Em intoxicações espontâneas, esse desaparecimento é bem mais marcado, estando provavelmente relacionado com a dosagem e tempo de ingestão da planta, que ocorreria em doses menores num espaço de tempo maior, enquanto que em animais experimentais, a quantidade de planta ingerida tem sido maior num espaço de tempo menor (Riet-Correa et al. 1983). Essa observação é feita também por Huxtable & Dorling (1982) na intoxicação espontânea por *Swainsona spp.*, onde a severidade das lesões variaria de acordo com a quantidade e tempo de ingestão da planta.

À medida que se observa o desaparecimento das células de Purkinje, nota-se a proliferação de células gliais em algumas áreas da camada de células de Purkinje, no animal de 32 dias de ingestão da planta, aumentando o número de áreas com essa proliferação nos animais com maior dosagem. Também na gangliosidose GM₁ em humanos, Goldman et al. (1981) descrevem essa alteração como microgliose cortical, e Piennar et al. (1976), na intoxicação por *Solanum kwebense*, observaram a proliferação de células gliais na camada de células de Purkinje. No presente trabalho essa gliose estava constituída principalmente por astrócitos e discreto número de células similares à microglia, e macrófagos, indicando que as células de Purkinje, uma vez que desaparecem, são substituídas por astrócitos fibrosos provenientes de células da microglia, que estariam realizando função de reparação. A transformação de células da microglia em astrócitos fibrosos em alterações do SNC foi descrita por Kitamura (1980).

Outra alteração a ser considerada é a presença de esferóides axonais que no animal com 24 dias de ingestão da planta, foram observados em pequeno número e tamanho, aparecendo simultaneamente as células de Purkinje discretamente vacuolizadas, aumentando em número com tamanho variável, conforme aumento da dosagem e tempo de ingestão da planta.

As alterações degenerativas da mielina foram observadas a partir de 32 dias de consumo da planta, progredindo à medida que foram aumentando os períodos experimentais e a dose de planta ingerida. Estudando a evolução de tais lesões, pareceria que, após o axônio apresentar-se inicialmente tumefeito e homogeneamente eosinófilico, e, posteriormente com diversos graus de vacuolização e lise, observa-se a degeneração da bainha de mielina caracterizada pela fragmentação e desaparecimento da mesma, constatando-se portanto que a degeneração da mielina seria secundária à alteração do axônio, o que é proposto também por O'Brien et al. (1969) na GM₁ gangliosidose humana. Posteriormente, o axônio e a bainha de mielina alterados seriam fagocitados por macrófagos, originando as microcavitações. Os macrófagos seriam, segundo Kitamura (1980) e Fujita (1980), oriundos de monócitos circulantes que migram através dos vasos para o parênquima nervoso. Esse quadro evolutivo caracteriza a denominada degeneração walleriana, observada em alterações do SNC por lesões do pericário com morte das células, ou na porção distal do axoplasma quando este é seccionado (Delahunta 1977). Neste caso a degeneração walleriana ocorreria como uma consequência da destruição e desaparecimento do corpo celular.

Simultaneamente com a degeneração do axônio e bainha de mielina, observou-se a presença de acúmulo perivascular constituído por macrófagos e outras células mononucleares. Esse fato pareceria indicar que o acúmulo perivascular ocorre secundariamente ao processo degenerativo, e as células que constituem esse acúmulo seriam células do sistema mononuclear fagocitário migrando para o SNC com o objetivo de fagocitar o material degenerado.

Outra alteração que apareceu em forma progressiva na substância branca cerebelar a partir dos 32 dias de iniciada a administração de planta foi a gliose, que era constituída preferencialmente de astrócitos, com alguns macrófagos, que estariam fagocitando e reparando áreas desmielinizadas.

Outro aspecto a ser discutido é a presença de células de Purkinje hiper Cromáticas e picnóticas, que, segundo Cammermeyer (1961), seriam artefatos decorrentes de manipulação e problemas de fixação do material por imersão em fixadores, indicando-nos a técnica de perfusão como ideal para fixação de SNC em animais experimentais. Esse fato foi confirmado neste trabalho, onde tais alterações aparecem freqüentemente nos materiais não perfundidos, observando-se menor número nos animais perfundidos, independentemente de tratamento.

No estudo da reversibilidade das lesões, comparando-se os animais abatidos imediatamente após finalizar o consumo da planta com os animais mantidos sem planta por 63 e 113 dias antes do abate, observou-se nesses últimos uma marcada redução na vacuolização das células de Purkinje e no número de esferóides, permanecendo as médias de células por campo, de acordo com a dosagem, similares. Considerando-se que as médias de células de Purkinje por campo são similares e que a vacuolização e os esferóides decrescem significativamente nos animais em que foi suprimida a administração de planta, sem, no entanto, apresentarem um grau de microcavitações compatível com o decréscimo desses esferóides axonais, depreende-se que as alterações das células de Purkinje e seus axônios são lentamente reversíveis, com exceção dos axônios pertencentes a células já desaparecidas que sofrem degeneração walleriana. Segundo Huxtable & Dorling (1982), na mannosidose induzida pela *Swainsona* a vacuolização neuronal é reversível, sendo observada por um período aproximado de 30 dias após o final da ingestão da planta, permanecendo, no entanto, as lesões que atingiram o ponto de irreversibilidade. A vacuolização neuronal é reversível também na lipidose induzida por drogas, após cessar o tratamento, quando este é feito em baixas concentrações (Drenckhahn & Lüllmann-Rauch 1979).

Com relação à presença de acúmulo perivascular e gliose na substância branca cerebelar, observou-se um aumento discreto dessas alterações nos animais que permaneceram sem planta quando comparados com os abatidos ao final da administração da planta. Esse aumento poderia ser devido a que, no momento de ser suspensa a administração, alguns esferóides, pertencentes provavelmente às células de Purkinje já desaparecidas, apresentavam uma lesão irreversível, razão pela qual o processo de degeneração walleriana continuou. Esse fato pareceria ser confirmado pela presença de microcavitações, resultantes desse processo, no animal que permaneceu mais tempo vivo após a suspensão da planta.

Como foi discutido anteriormente, o estudo da evolução e reversibilidade das lesões demonstrou a semelhança entre as alterações produzidas pela intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* e as que ocorrem em diferentes doenças do armazenamento que afetam o SNC. Como através das técnicas histoquímicas não foi possível demonstrar a presença de substâncias armazenadas nas células, é evidente a necessidade de realizar estudos bioquímicos que permitam o esclarecimento da patogenia da enfermidade.

O experimento em ovinos demonstrou que essa espécie é suscetível à intoxicação, porém pareceria provável que necessitem de uma dosagem maior e mais tempo de administração da planta do que os bovinos, já que nas condições deste experimento não foram observados gliose nem acúmulo perivascular de células similares às encontradas nos cerebelos de bovinos.

Os experimentos em coelhos, cobaias e ratos demonstraram que, com as doses e via utilizadas, essas espécies não são suscetíveis à intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*, razão pela qual é impossível a utilização desses animais de laboratório no estudo da patogenia da enfermidade, pelo menos até serem testadas maiores doses.

REFERÊNCIAS

- Baker Jr. H.J., Lindsey R.J., Mckham G.M. & Farrel D.F. 1971. Neuronal GM₁ gangliosidosis in a Siamese cat with B-galactosidase deficiency. *Science* 174: 838-839.
- Barros S.S. 1982. Comunicação pessoal, Universidade Federal de Santa Maria.
- Cammermeyer J. 1961. The importance of avoiding "Dark" neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropath.* 1: 245-270.
- Delahunta A. 1977. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology.* W.B. Saunders, Philadelphia. 439 p.
- Donnelly W.J.C. & Sheahan B.J. 1981. GM₁ gangliosidosis of Friesian calves: a review. *Irish Vet. J.* 35: 45-55.
- Dorling P.R., Huxtable C.R. & Vogel P. 1978. Lisossomal storage in *Swainsona* spp. toxicosis: a induced mannosidosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 4: 285-295.
- Drenckhahn D. & Lüllmann-Rauch R. 1979. Drug induced experimental lipidosis in the nervous system. *Neuroscience* 4: 697-712.
- Fujita S. 1980. Cytogenesis and pathology of neuroglia and microglia. *Path. Res. Pract.* 168: 271-278.
- Goldmann J.E., Katz D., Rapin I., Purpura D.P. & Suzuki K. 1981. Chronic GM₁ gangliosidosis presenting as dystonia. I. Clinical and pathology features. *Ann. Neurol.* 9: 465-475.
- Huxtable C.R. & Dorling P.R. 1982. Poisoning of livestock by *Swainsona* spp: current status. *Aust. Vet. J.* 59: 50-53.
- Huxtable C.R. 1969. Experimental reproduction and histopathology of *Swainsona galegifolia* poisoning in the guinea-pig. *Aust. J. Exp. Biol. Sci.* 47: 339-347.
- James L.F., Kampen K.R. Van & Hartley W.J. 1970. Comparative pathology of *Astragalus* (locoweed) and *Swainsona* poisoning in sheep. *Path. Vet.* 7: 116-125.
- James L.F., Hartley W.J. & Kampen K.R. Van 1981. Syndromas of *Astragalus* poisoning in livestock. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 178(2): 146-150.
- Jolly R.D. & Blakemore W.F. 1973. Inherited lysosomal storage diseases: an essay in comparative medicine. *Vet. Rec.* 92: 391-400.
- Jolly R.D. & Hartley W.J. 1977. Storage diseases of domestic animals. *Aust. Vet. J.* 53: 1.
- Jolly R.D. 1982. Two models of lysosomal storage diseases. In: *Animal Models in Inherited Metabolic Diseases.* Allan R. Liss, New York, p. 148-163.
- Jones M.Z., Cunningham J.G., Dawson G., Laine R.A., Williams C. S.F., Alessi D.M., Motosky U.V. & Vorro J.R. 1982. Caprien B-mannosidosis. *Animal models in inherited metabolic diseases.* Allan R. Liss, New York, p. 165-176.
- Kitamura T. 1980. Dynamic aspects of glial reactions in altered brains. *Pathol. Res. Pract.* 168: 301-343.
- Kosanke S.D., Pierce K.R. & Read W.K. 1979. Morphogenesis of light and electron microscopic lesions in porcine GM₂ gangliosidosis. *Path. Vet.* 16: 6-17.
- Laws L. & Auson R.B. 1968. Neuropathy in sheep fed *Swainsona luteola* and *S. galegifolia*. *Aust. Vet. J.* 44: 447-452.
- Leipold I.W., Smith J.E., Jolly R.D. & Eldrige F.E. 1979. Mannosidosis of Angus calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 175(5): 457-459.
- Locke K.B., Mcewab D.R., Hamdorf I.J. 1980. Experimental poisoning of horses and cattle with *Swainsona canescens* var. *horniana*. *Aust. Vet. J.* 56: 379-383.
- Matsui T., Kuroda S., Mizutani M., Kiuchi Y., Suzuki K. & Ono T. 1983. Generalized glycogen storage diseases in Japanese quail (*Conturnix japonica*). *Vet. Pathol.* 20: 312-321.
- O'Brien J.S. 1971. Ganglioside-storage diseases. *N. Eng. J. Med.* 284: 893-896.
- O'Brien J.S., Okada S., Ho M.W., Fillerup D.L., Vath M.L. & Adams K. 1971. Gangliosidosis storage diseases. *Fed. Proc.* 30(3): 956-969.
- Piennar J.G., Kellerman T.S., Basson P.A., Jenkins W.L. & Vahrmeyer J. 1976. Maldronsiekte in cattle: a neuropathy caused by *Solanum kwebense* N.E. *Br. Onderstepoort J. Vet. Res.* 43: 67-74.
- Pierce K.R., Kosanke S.D., Bayw W. & Bridges C.H. 1976. Porcine cerebrospinal lipodystrophy (GM₂ gangliosidosis). *Am. J. Path.* 83: 419-422.
- Read D.H., Harrington D.D., Keenan T.W. & Hinsman E.J. 1976. Neuronal visceral GM₁ gangliosidosis in dog with B-galactosidase deficiency. *Science* 194(4263): 442-445.
- Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Summers B.A. & Oliveira J.A. 1983. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. *Cornell Vet.* 73(3): 240-256.
- Walvoort H.C. 1983. Glicogen storage diseases in animals and their potential value as models of human disease. *J. Inher. Metabol. Dis.* 6: 3-16.
- Wolfe L.S., Callhan J., Fawcetti J.S., Andermann F. & Scriver C.R.. 1970. GM₁ gangliosidosis without chondrodystrophy or visceromegaly. *Neurology* 20: 23-44.