



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Ramaria flavo-brunnescens* EM
BOVINOS: ESTUDO DA PATOGENIA**

Sandro Vargas Schons

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Dra. Ana Lucia Schild, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2006**

SANDRO DE VARGAS SCHONS

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Ramaria flavo-brunnescens* EM
BOVINOS: ESTUDO DA PATOGENIA**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Pelotas, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Patologia Animal, para a obtenção
do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).**

Orientadora: Dra. Ana Lucia Schild

Co-Orientadora: Prof^ª Dra. Margarida Buss Raffi

PELOTAS

Rio Grande do Sul – Brasil

Fevereiro 2006

RESUMO

SCHONS, Sandro Vargas. **Intoxicação experimental por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos: estudo da patogenia** 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Laboratório Regional de Diagnóstico, Universidade Federal de Pelotas.

Com o objetivo de estudar a patogenia das lesões que ocorrem nos cascos, na língua e na pele da cauda de bovinos intoxicados por *Ramaria flavo-brunnescens*, este cogumelo foi triturado em liquidificador imediatamente após a coleta entre março e maio de 2004, e administrado, através de sonda oro-gástrica, a três bovinos da raça Jersey com 9-10 meses de idade. A dose diária administrada foi de aproximadamente 20g/kg de peso vivo durante 7 (1 bovino) e 13 dias (2 bovinos), perfazendo totais de 140, 268 e 261g/kg de peso vivo a cada animal, respectivamente. Após a administração do cogumelo os bovinos recebiam ração comercial na dose de 1% do peso corporal e água a vontade e permaneciam em um potreiro de campo nativo. Um bovino de mesma raça e idade foi utilizado como controle. Os sinais clínicos observados nos bovinos intoxicados, caracterizaram-se por apatia, anorexia, hiperemia da mucosa oral, alisamento da superfície dorsal da língua, hipersensibilidade dos cascos e queda dos pêlos longos da cauda quando levemente tracionados. Os animais foram eutanasiados e necropsiados no 8º (1 bovino) e no 15º dias (2 bovinos) após o início do experimento, juntamente com o controle. Histologicamente observou-se o epitélio da superfície dorsal da língua estreito com ausência das papilas filiformes, vacuolização dos queratinócitos e desprendimento da superfície queratinizada. Na região laminar do casco observou-se vacuolização das lâminas epidérmicas, hiperplasia dos queratinócitos e queratinização irregular e flocular. Na pele da cauda observou-se hiperqueratose ortoqueratótica e vacuolização da bainha radicular externa e espessamento da queratina tricolemal e infiltrado inflamatório mononuclear ao redor dos folículos. No estudo imunoistoquímico utilizando os anticorpos policlonal anti-(pan)citoqueratina e para marcação da proliferação celular o anticorpo primário monoclonal anti-Ki-67, não foram observadas diferenças entre o epitélio da superfície dorsal da língua dos três bovinos intoxicados e o do bovino controle. No estudo por microscopia eletrônica observou-se diminuição dos tonofilamentos e espaços intercelulares acentuadamente dilatados.

Palavras chaves: intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens*, cogumelo, doença de bovinos, imunohistoquímica.

ABSTRACT

SCHONS, Sandro Vargas. **Experimental intoxication by *Ramaria flavo-brunnescens* in cattle: study of pathogenesis** 2006 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Laboratório Regional de Diagnóstico, Universidade Federal de Pelotas.

This study was carried out to determine the pathogenesis of the lesions observed in the hooves, tongue and stem (tail) of cattle poisoned by *Ramaria flavo-brunnescens*. The mushroom was collected daily between March and May 2004, immediately liquefied with water and given to three Jersey calves aged 9-10 months. Daily doses were approximately 20g/kg of body weight during 7 (1 calf) on 13 days (2 calves), additionally the calves were fed with concentrated commercial ration, water, and native pasture. The total doses of mushroom given were 140, 268, and 261g/kg of body weight. One calf with same age and breed was used as control. Clinical signs were characterized by anorexia, hyperemia of oral mucosa, hypersensitivity of the hooves and loosening of the long hairs of tail. The experimental calves were euthanatized and necropsied on days 8 (1 calf) and 15 (2 calves) after the beginning of the experiment. Microscopic lesions were characterized by smoothness of dorsal epithelium of the tongue with loss the tip of filiform papillae and vacuolation of keratinocytes. There was vacuolation and irregular keratinization in the lamellar epidermis and hyperplasia of keratinocytes. In the skin of tail hyperkeratosis, vacuolation of the external root sheath and inflammatory infiltration around hair follicles. Were observed Immunohistochemical results with anti-cytokeratin and anti-Ki67 (Mib-1) antibodies demonstrated no differences between the dorsal epithelium of the tongue of control and experimental calves. Ultrastructural study demonstrated decrease in tonofilaments and increase intercellular spaces.

Keywords: poisoning by *Ramaria flavo-brunnescens*, mushroom, cattle diseases, cattle, immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	A. Bosque de eucaliptos onde foi colhida <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> para a administração aos bovinos e, no detalhe, em meio a folhas de eucalipto. B. Cogumelo em maior aumento.....	18
Figura 2.	Corte sagital de dígito bovino. As linhas vermelhas mostram os cortes realizados no casco dos bovinos intoxicados e controle após a fixação. As linhas amarelas indicam os limites das estruturas coletadas para o processamento histoquímico.....	19
Figura 3.	Vista frontal de dígito bovino mostrando as estruturas laminares do casco estudadas histologicamente. No detalhe: lâminas epidérmicas e córion.....	19
Figura 4.	Bovino nº 1 intoxicado por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> em decúbito esternal cinco dias após o início do experimento.....	23
Figura 5.	Bovino nº 1 intoxicado por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> . Retirada dos pêlos longos da cauda com leve tração.....	23
Figura 6.	Bovino nº 1 intoxicado por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> . A. Na porção anterior da superfície da língua observa-se atenuação das papilas filiformes e alisamento principalmente nos bordos laterais, presença de erosão na região central. B. Língua de bovino controle.....	24
Figura 7.	Língua de bovino controle (A) e bovino nº 1 (B). Observa-se marcada diferença na espessura do epitélio da superfície dorsal da língua (setas) e a presença de numerosas papilas filiformes (A) (cabeça de seta), em menor número no bovino intoxicado (B). (HE, sub-macroscópica).....	25

Epitélio da superfície dorsal da língua do bovino nº1. Observa-se epitélio estreito com vacuolização dos queratinócitos na base das papilas filiformes e descamação da camada córnea (A). Epitélio

Figura 8.	da superfície dorsal da língua de bovino controle (B). (HE Obj.20x).....	26
Figura 9.	Epitélio da superfície dorsal da língua do bovino nº1. Observa-se estreitamento do epitélio e degeneração e necrose da camada superficial do estrato espinhoso (A) e vacuolização dos queratinócitos (B). Epitélio da língua de bovino controle com queratinização normal (C). (HE Obj. 40x).....	27
Figura 10.	Língua do bovino nº 1. Observa-se espongirose no estrato basal, disqueratose (seta), vacuolização dos queratinócitos e desprendimento da camada queratinizada do epitélio. (HE Obj.20X).....	28
Figura 11.	Epitélio da superfície dorsal da língua do bovino nº 3. Observa-se atenuação da camada de queratina (A). Epitélio da língua de bovino controle mostrando a aparência normal das papilas filiformes (B). (HE Obj.10x).....	29
Figura 12.	Casco do bovino nº 1. Observa-se degeneração dos queratinócitos das lâminas epidérmicas com queratinização flocular (A). Lâminas epidérmicas do casco de bovino controle (B). (HE Obj.20X).....	30
Figura 13.	Pele da cauda do bovino nº 1. Observa-se hiperqueratose ortoqueratótica. (HE Obj.10x).....	31
Figura 14.	Pele da cauda do bovino nº 1. Alguns folículos apresentam vacuolização da bainha radicular externa (A), espessamento da queratina tricolemal (setas) (A e B) e infiltrado inflamatório mononuclear ao redor dos folículos (*) (B). (HE Obj.10x).....	32
Figura 15.	Imunohistoquímica para marcação de proliferação celular com o anticorpo primário monoclonal anti-Ki-67. Não se observam diferenças de marcação celular entre o bovino nº 1 intoxicado (A) e o bovino controle (B). (Obj.40x).....	33
Figura 16.	Imunohistoquímica utilizando anticorpo policlonal anti-pancitoqueratina bovina. A. Corte histológico de papila filiforme da língua do bovino nº 1 apresentando vacuolização dos queratinócitos e desprendimento da superfície queratinizada (HE Obj.10x). B. Observa-se um padrão irregular na distribuição da marcação para pancitoqueratina, semelhante ao que foi observado no bovino controle (Obj.10x). C. Controle negativo para anticorpo anti-pancitoqueratina (Obj.10x).....	34
Figura 17.	Bovino experimentalmente intoxicado com <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> . Os queratinócitos da camada espinhosa do epitélio da língua mostram diminuição dos tonofilamentos e dilatação dos espaços intercelulares (seta). N= núcleo. Barra =2µm.....	

Figura 18. Bovino controle. Os queratinócitos da camada espinhosa mostram padrão de distribuição normal dos tonofilamentos. Barra = 2μm.....	35
	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Intoxicação experimental por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> em bovinos, dados referentes aos animais e ao experimento.	17
----------	--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Intoxicação espontânea	4
2.1.1 Epidemiologia.....	4
2.1.2 Sinais clínicos.....	5
2.1.3 Patologia.....	6
2.1.4 Diagnóstico diferencial.....	7
2.2 Intoxicação experimental.....	8
2.2.1 Toxicidade.....	10
2.2.2 Patogenia.....	11
2.3 Processo de queratinização.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4 RESULTADOS.....	20
4.1 Sinais clínicos	20
4.2 Patologia.....	20
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÕES.....	41
7 REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* era freqüente no Uruguai e no sul do Brasil durante a década de 50 e quando a etiologia da enfermidade foi esclarecida houve diminuição na incidência da doença. Por outro lado, nos últimos anos a freqüência da intoxicação tem aumentado em bovinos e ovinos devido ao aumento de áreas de reflorestamento com plantio de eucaliptos, as quais são utilizadas, também, para a criação dessas espécies animais (RIVERO *et al.*, 2000).

A intoxicação espontânea por *Ramaria flavo-brunnescens* tem sido descrita em bovinos de diferentes idades e raças, no Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo com taxas de morbidade variando de 10% a 100% e mortalidade de 10% a 90% (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; RIET-CORREA *et al.*, 1983; BARROS *et al.*, 2006), no Uruguai (FREITAS *et al.*, 1966), e na Argentina (PERUSIA & RODRIGUEZ-ARMESTO, 1992).

Em ovinos a doença tem sido reportada no Uruguai (FREITAS *et al.*, 1966; SCHILD *et al.*, 1996) e nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA *et al.*, 1983) e São Paulo (PRUCOLI & CAMARGO, 1966). A taxa de morbidade nesta espécie varia de 1% a 100% e a mortalidade pode ser de 0 a 100%.

A intoxicação foi descrita, também, em búfalos no Rio Grande do Sul (ROZZA *et al.*, 2004), em eqüinos (SANTOS *et al.*, 1975; BARROS, 2005) e suínos (FREITAS *et al.*, 1966).

O estudo das lesões que ocorrem na intoxicação experimental pelo cogumelo *R. flavo-brunnescens* em bovinos tem sugerido que as alterações envolvem estruturas que sofrem queratinização dura, com interferência no metabolismo dos aminoácidos sulfurados nos queratinócitos, principalmente da cistina, resultando no enfraquecimento da estrutura molecular da queratina dura por

deficiência de enxofre, levando à queda dos cascos, dos pêlos da extremidade da cauda, dos chifres e ao desaparecimento das papilas filiformes linguais (KOMMERS & SANTOS, 1995). Por outro lado, SALLIS *et al.* (1993) estudando a intoxicação em ovinos sugeriram que as lesões seriam provocadas por uma substância vasoconstritora presente no cogumelo, cuja estimulação persistente na musculatura lisa da túnica média das arteríolas, resultaria em espessamento da mesma e vasoconstrição, o que teria como consequência necrose coagulativa e ulceração do epitélio irrigado por esses vasos. Esse mecanismo seria semelhante ao que ocorre no ergotismo.

Os objetivos deste trabalho foram descrever as alterações iniciais que ocorrem na língua, nos cascos e na pele da cauda de bovinos intoxicados por este cogumelo utilizando as técnicas de histoquímica, imunohistoquímica (IHQ) e microscopia eletrônica e com isso, propor uma patogenia ou corroborar com as patogenias propostas anteriormente para as lesões causadas por este cogumelo, nessa espécie animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Ramaria flavo-brunnescens é um cogumelo pertencente à família Clavariaceae, encontrado em solos de bosques de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). Apresenta frutificações com cerca de 11cm de altura, profusamente ramificadas, semelhantes a uma couve-flor. A coloração da superfície é variável entre o amarelo-claro e o alaranjado. Após o dessecamento a coloração torna-se castanha-clara, exceto na base, onde permanece esbranquiçada (FIDALGO & FIDALGO, 1970).

A espécie *Ramaria flavo-brunnescens* foi originariamente descrita nos Estados Unidos conhecida pelo nome de *Clavaria flavo* (FIDALGO & FIDALGO, 1970). No Brasil o cogumelo é encontrado nas regiões Sul e Sudeste (BAUER *et al.*, 1966; PRUCOLI & CAMARGO, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; PASCHOAL *et al.*, 1983; RIET-CORREA *et al.*, 1985). Ocorre, também, no Uruguai (FREITAS *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973), na Argentina (PERUSIA & RODRIGUEZ-ARMESTO, 1992), na China e na Austrália, sendo pouco conhecido na Europa (FIDALGO & FIDALGO, 1970).

Alguns estudos têm demonstrado que a intoxicação por este cogumelo causa alterações no processo de queratinização, especialmente nas regiões onde os epitélios sofrem queratinização dura (KOMMERS & SANTOS, 1995). Por tratar-se de uma intoxicação experimental para estudar a patogenia das lesões causadas em bovinos, a presente revisão está dividida entre três itens principais: o primeiro tratando da intoxicação espontânea, especialmente em seus aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos, o segundo tratando da intoxicação experimental, com ênfase nas patogenias propostas, e o terceiro fazendo uma breve exposição sobre o processo de queratinização dos epitélios.

2.1 Intoxicação espontânea

2.1.1 Epidemiologia

Ramaria flavo-brunnescens ocorre no Rio Grande do Sul, de fevereiro a junho (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; RIET-CORREA *et al.*, 1985) em São Paulo, no verão (PRUCOLI *et al.*, 1966; PASCHOAL *et al.*, 1983) e no Uruguai durante o verão e o outono (FREITAS *et al.*, 1966) e, ocasionalmente, na primavera (QUIÑONES-SOWERBY, 1973). A proliferação do cogumelo é muito intensa após períodos chuvosos seguidos de dias quentes (PASCHOAL *et al.*, 1983). O cogumelo é palatável para os animais que o procuram para comer (SANTOS, 1991).

Intoxicação espontânea por *Ramaria flavo-brunnescens* tem sido descrita em bovinos no Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; RIET-CORREA *et al.*, 1983; 1985; SCHILD *et al.*, 1996, BARROS, 2005) e São Paulo (PASCHOAL *et al.*, 1983); no Uruguai (FREITAS *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973); e na Argentina (PERUSIA & RODRIGUEZ-ARMESTO, 1992). A taxa de morbidade nesta espécie varia de 10% a 100% e a mortalidade de 10% a 90%. São afetados bovinos de diferentes idades e de qualquer raça (BAUER *et al.*, 1966; FREITAS *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; PASCHOAL *et al.*, 1983; RIET-CORREA *et al.*, 1985; SCHILD *et al.*, 1996).

Em ovinos a doença tem sido reportada no Uruguai (FREITAS *et al.*, 1966) e nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA *et al.*, 1983) e São Paulo (PRUCOLI & CAMARGO, 1966). As taxas de morbidade e mortalidade nesta espécie são muito variáveis podendo chegar a 50% e são afetados ovinos de diferentes idades (QUIÑONES-SOWERBY, 1973)

A intoxicação espontânea ocorre, também, em eqüinos (SANTOS *et al.*, 1975; BARROS, 2005) e suínos (FREITAS *et al.*, 1966), mas os sinais clínicos e a patologia não têm sido descritos nestas espécies.

2.1.2 Sinais clínicos

Os bovinos intoxicados espontaneamente apresentam anorexia, depressão, claudicação, intensa sialorréia, atrofia das papilas linguais com

conseqüente alisamento da língua, afrouxamento dos pêlos longos da extremidade da cauda e das regiões cervical e lombar, desprendimento da porção córnea dos cascos e dos chifres e hemorragias oculares com posterior cegueira (BARROS, 1958; BAUER *et al.*, 1966; FREITAS *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; SANTOS *et al.*, 1975; PASCHOAL *et al.*, 1983; RIET-CORREA *et al.*, 1985; SCHILD *et al.*, 1996). Observa-se, também, emagrecimento progressivo (SANTOS *et al.*, 1975; PASCHOAL *et al.*, 1983; RIET-CORREA *et al.*, 1985), atonia ruminal (BAUER *et al.*, 1966), fezes mucosas e sanguinolentas (BAUER *et al.*, 1966; FIDALGO & FIDALGO, 1970), e abortos (BARROS, 1958; BAUER *et al.*, 1966; SCHILD *et al.*, 1996). São observados, ainda, hiperemia na região coronária, dermatite interdigital e perda do estojo córneo dos dígitos acessórios, edema submandibular e fotossensibilização. Os animais permanecem deitados, demonstrando dificuldade para levantar-se e locomover-se, evidenciando sinais de dor (RIET-CORREA *et al.*, 1985). Em um surto ocorrido na região central do Rio Grande do sul no outono de 2005 o autor observou, também, desidratação, hipópion, hifema e opacidade da córnea, além dos sinais descritos acima (BARROS *et al.*, 2006).

O curso clínico da doença espontânea é, em média, de 30 dias. Os animais podem se recuperar (BAUER *et al.*, 1966; FREITAS *et al.*, 1966; BARROS *et al.*, 2006) ou emagrecer progressivamente, morrendo entre 8 e 12 dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (FREITAS *et al.*, 1966).

Os sinais clínicos da intoxicação espontânea em ovinos são marcadamente diferentes dos sinais clínicos em bovinos e caracterizam-se por convulsões, tremores musculares, ataxia, hipermetria, nistagmo e opistótono. Os animais podem adquirir uma postura com a cabeça levantada para cima (olhar para cima). Alguns animais permanecem em decúbito e apresentam movimentos de pedalagem podendo morrer dentro de 20 a 30 dias, mas podem recuperar-se se são alimentados (FREITAS *et al.*, 1966).

2.1.3 Patologia

Macroscopicamente, nos casos naturais de intoxicação em bovinos, observam-se lesões descamativas ou ulcerativas na língua, com alisamento da superfície dorsal, ulcerações na mucosa do esôfago (BAUER *et al.*, 1966;

SANTOS *et al.*, 1975; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; SCHILD *et al.*, 1996) as quais podem ser lineares, semelhantes às causadas pelo vírus da diarreia viral bovina (BARROS *et al.*, 2006), hiperemia e necrose nas paredes do abomaso e congestão nos intestinos (BAUER *et al.*, 1966, BARROS, *et al.*, 2006). O fígado pode apresentar-se aumentado de tamanho com aspecto de noz-moscada e a vesícula biliar apresenta edema e congestão das paredes (FREITAS *et al.*, 1966, RIET-CORREA *et al.*, 1985). Outros sinais observados são hemorragias na câmara anterior do olho e opacidade da córnea (BAUER *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; SANTOS *et al.*, 1975; SCHILD *et al.*, 1996), hiperemia e ulcerações nos rodets coronários e desprendimento de cascos e chifres. Pode observar-se, ainda, aumento do líquido cefalorraquidiano e hiperemia das meninges (BARROS *et al.*, 2006).

As lesões macroscópicas nos casos experimentais assemelham-se àquelas dos casos naturais, podendo ser mais discretas (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; KOMMERS & SANTOS, 1993).

No exame histológico dos casos descritos em bovinos encontram-se lesões hiperplásicas na epiderme da pele da cauda, caracterizadas por hiperqueratose ortoqueratótica e folículos pilosos com espessa camada de queratina tricolemal, formando tampões queratínicos (BARROS *et al.*, 2006) e, ainda reação inflamatória na derme (RIET-CORREA *et al.*, 1985).

Na mucosa da língua observam-se lesões inflamatórias e necróticas; a submucosa da língua e do esôfago apresenta áreas hemorrágicas com congestão nos vasos sangüíneos e presença de trombos (FREITAS *et al.*, 1966). BARROS *et al.* (2006) observou atrofia do epitélio de revestimento da língua e desaparecimento das papilas filiformes, áreas de disqueratose e áreas de espongiose da camada de células basais.

Tem sido descrito, também, degeneração hidrópica no epitélio do esôfago e hiperqueratose (RIET-CORREA *et al.*, 1985). No fígado há necrose centrolobular e congestão, bem como reação inflamatória nos espaços porta. No abomaso e intestinos ocorre necrose do epitélio com reação inflamatória na mucosa e submucosa (SANTOS *et al.*, 1975; RIET-CORREA *et al.*, 1985). Presença de úlceras focais ou focalmente extensas no abomaso foram descritas em bovinos naturalmente intoxicados (BARROS, 2005). Observa-se, também, infiltrado

inflamatório na córnea, hemorragia da íris e discreta reação inflamatória no sistema nervoso central (SANTOS *et al.*, 1975).

No encéfalo de bovinos em dois surtos descritos na região central do Estado foi observado em seis de nove animais necropsiados lesão simétrica e focal de necrose, restrita ao bulbo, na altura do óbex, afetando a substância branca caracterizada por rarefação dos núcleos dorsal do vago e do núcleo do nervo hipoglosso, degeneração neuronal e edema. Em alguns casos havia substituição do neurópilo por acúmulo de células gitter (BARROS *et al.*, 2006).

Em ovinos tem sido observado espessamento das capas musculares das arteríolas e tumefação endotelial, seguidas por degeneração, necrose e ulceração nos cascos e língua (SALLIS *et al.*, 1993; 2000).

2.1.4 Diagnóstico diferencial

A intoxicação por *Ramaria* pode ser confundida com enfermidades infecciosas como febre catarral maligna e febre aftosa. Na primeira, os sinais clínicos caracterizam-se por anorexia, salivação e lesões ulcerativas e erosivas na mucosa oral, além de hiperemia da conjuntiva ocular e esclera (RECH *et al.*, 2005), as quais são semelhantes ao observado na intoxicação por *Ramaria*. Na febre aftosa claudicação e salivação e as lesões na mucosa oral são, também, similares ao que ocorre na intoxicação pelo cogumelo, porém neste caso, não há formação de vesículas na fase inicial da enfermidade. A intoxicação por *Ramaria* pode ser confundida, também, com a forma gangrenosa da intoxicação por ergocalcóis produzidos pelo *Claviceps purpurea*, que ocorre principalmente nos meses de inverno e caracteriza-se por claudicação com edema e hiperemia da pele na região do rodete coronário, boleto e quartela. Estas lesões evoluem para necrose que pode ser observada, também, nos bordos das orelhas, extremidade dos tetos e da cauda (RIET-CORREA, 1991). Lesões de necrose das extremidades não têm sido observadas na intoxicação espontânea por *Ramaria flavo-brunnescens*. Apenas em um surto em búfalos ocorrido no Estado é mencionada a necrose das pontas das orelhas e cauda em animais intoxicados (ROZZA *et al.*, 2004).

A intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* foi inicialmente confundida com intoxicação crônica por selênio (BARROS, 1958). A “alkali disease”, como é

conhecida causa lesões nos folículos pilosos, com perda dos pêlos longos da cauda e, também, lesões nos cascos similares ao que ocorre na intoxicação pelo cogumelo (O'TOOLE & RASISBECK, 1995). Lesões, na língua, entretanto não são descritas nesta enfermidade.

2.2 Intoxicação experimental

A intoxicação pelo cogumelo foi reproduzida experimentalmente em ovinos (PRUCOLI & CAMARGO, 1966; SALLIS *et al.*, 1993, 2000) e em bovinos (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; KOMMERS & SANTOS, 1995). A intoxicação foi reproduzida experimentalmente, também em cobaios (BAUER *et al.*, 1966; FREITAS *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; EICHSTAEDT *et al.*, 2000) e em camundongos (MAGALHÃES *et al.*, 1975).

Na intoxicação experimental, os sinais clínicos em bovinos caracterizaram-se por sialorréia, atrofia da papilas linguais, queda dos pêlos longos da extremidade da cauda, emagrecimento, diminuição do apetite, corrimento seroso nasal e ocular e dificuldade na deglutição. Lesões nos cascos e chifres e hemorragias oculares não foram observadas nos casos experimentais (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975). Em outro trabalho de intoxicação experimental foi observado, também, hipersensibilidade nos cascos, evidenciada por períodos prolongados de decúbito, e avermelhamento da região coronária que eventualmente se estendia para as porções distais do casco e para o espaço interdigital (KOMMERS & SANTOS, 1995).

Ovinos intoxicados experimentalmente apresentam sinais neurológicos caracterizados por ataxia, midríase, decúbito lateral com movimentos de pedalagem e, ainda, sialorréia e opacidade da córnea (PRUCOLI & CAMARGO, 1966; SALLIS *et al.*, 1993; 2000). São observados, também, hipertermia, poliúria, hiperemia da conjuntiva, hemorragia da câmara anterior do olho, ulceração da língua e presença de linha hiperêmica e crostas no rodete coronário. A morte ocorre em aproximadamente 3-4 dias após o início dos sinais clínicos (SALLIS *et al.*, 1993; 2000).

Em cobaios, a administração do cogumelo *ad libitum* resultou no 4º dia de experimento em sialorréia e conjuntivite, pêlos arrepiados e prostração com a morte ocorrendo no 6º dia após o início do experimento. Neste trabalho não são

descritas as lesões histológicas observadas (BAUER et al, 1966). Nesta espécie, outro trabalho menciona lesões macrocópicas e histológicas similares às observadas em bovinos (FREITAS et al., 1966; QUIÑONES & SOWERBY, 1973). EICHSTAEDT et al. (2000) observaram sialorréia e lesões ulcerativas na região dorsal da língua, caracterizadas microscopicamente por necrose e infiltrado de neutrófilos na camada granular da mucosa; no esôfago havia intenso infiltrado de neutrófilos e necrose da mucosa. Em cobaios, outros experimentos realizados demonstraram a presença de colônias bacterianas nas lesões inflamatórias, sugerindo a possibilidade de que as mesmas poderiam ser devidas à passagem da sonda oro-gástrica utilizada para a administração do cogumelo aos animais (RAFFI & SCHILD, 2000. Dados não publicados).

Em camundongos, a tentativa de reprodução experimental foi realizada com a administração intraperitoneal do extrato aquoso de *Ramaria flavo-brunnescens* sendo verificado apenas que os animais morriam após a administração (MAGALHÃES et al., 1975).

2.2.1 Toxicidade

Em bovinos a administração de 5g/kg de peso vivo/dia do cogumelo durante 5 dias produz sinais clínicos da doença e a dose mínima diária de 20-25g/kg de peso vivo causa sinais clínicos em 3-6 dias e a morte em 15-40 dias (SANTOS et al., 1975; KOMMERS & SANTOS, 1995). A dose única de 36g/kg provoca sinais clínicos e morte em 13 dias (SANTOS et al., 1975). Os sinais clínicos iniciam a partir do quinto dia quando são ingeridos entre 5 e 27g/kg/dia. Ovinos são mais resistentes à intoxicação do que os bovinos. PRUCOLI & CAMARGO (1966) produziram a intoxicação nesta espécie pela administração de 250g do cogumelo por kg de peso vivo por dia, durante 30 dias. Em outros experimentos a menor quantidade de *R. flavo-brunnescens* que causou a intoxicação foi de 167g/kg de peso, administrados em 9 dias. A administração de 200g/kg em 3-10 dias causou a morte após 5-13 dias (SALLIS et al., 2000). Em cobaios a intoxicação foi produzida pela administração *ad libitum* (BAUER et al., 1966; FREITAS et al., 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973) e pela administração de 50-75g/kg de peso vivo por dia durante três dias (EISCHTAEDT et al., 2000).

Têm sido demonstradas variações na toxicidade de *Ramaria flavo-brunnescens* em diferentes anos nos mesmos locais, sendo observado que em alguns anos o cogumelo não é tóxico (SALLIS *et al.*, 2000). O cogumelo perde rapidamente a toxicidade após ser coletado, não é tóxico quando dessecado, perdendo consideravelmente a toxicidade após o congelamento (SALLIS *et al.*, 2004; KOMMERS & SANTOS, 1995). O consumo após a cocção não oferece riscos e o princípio tóxico parece ter efeito acumulativo (FIDALGO & FIDALGO, 1970). Análises toxicológicas do cogumelo revelaram um alcalóide volátil e/ou termolábil (BAUER *et al.*, 1966; FIDALGO & FIDALGO, 1970). Outros autores sugerem que o princípio ativo seja um glicosídeo produzido pelo cogumelo ou pela sua degradação por fungos microscópicos (FREITAS *et al.*, 1966).

Não foram observados níveis tóxicos de selênio nem de outros minerais no cogumelo, na terra e em diversos vegetais procedentes de locais afetados (FREITAS *et al.*, 1966). Determinações de selênio em amostras de fígado e de pêlos de animais suspeitos de intoxicação por *R. flavo-brunnescens* estavam abaixo dos níveis considerados tóxicos (BAUER *et al.*, 1966).

2.2.2 Patogenia

Pelo estudo experimental da intoxicação pelo cogumelo *R. flavo-brunnescens* em bovinos, foi verificado que as alterações envolvem estruturas que sofrem queratinização dura, sugerindo que haja interferência no metabolismo dos aminoácidos sulfurados nos queratinócitos, principalmente da cistina, resultando no enfraquecimento da estrutura molecular da queratina dura por deficiência de enxofre, levando à queda dos cascos, dos pêlos da extremidade da cauda, dos chifres e ao desaparecimento das papilas filiformes linguais (KOMMERS & SANTOS, 1995). Neste trabalho, os autores sugerem que a formação de queratina defeituosa ou a ausência de queratinização estariam relacionadas à formação deficiente de matriz protéica interfibrilar que contém as ligações dissulfeto, as quais estabilizam os componentes estruturais conferindo à queratina dura suas propriedades elásticas, químicas e biológicas e a resistência mecânica.

Por outro lado, SALLIS *et al.* (2000) trabalhando com ovinos intoxicados experimentalmente, sugeriram que as lesões seriam provocadas por uma substância vasoconstritora presente no cogumelo, cuja estimulação persistente na

musculatura lisa da túnica média das arteríolas, resultaria em espessamento da mesma e vasoconstrição, o que teria como consequência necrose coagulativa e ulceração do epitélio irrigado por esses vasos. Esse mecanismo seria semelhante ao que ocorre no ergotismo.

2.3 Processo de queratinização

As queratinas são substâncias proteináceas fibrosas (filamentos de queratina) ou amorfas (filamentos intermediários ligados à proteína) produzidos pelas células epidérmicas da pele ou das camadas superficiais de determinados órgãos, não sendo uma secreção celular, mas o resultado final da transformação das células epiteliais denominadas de queratinócitos (TOMLINSON *et al.*, 2004).

A camada mais profunda da epiderme é constituída por células colunares baixas e denominada de extrato germinativo. Novos queratinócitos são deslocados dessa camada para as camadas mais superficiais da epiderme. No microscópio eletrônico observa-se que as células desta camada possuem um número substancial de filamentos intermediários do tipo pré-queratina, conhecidos, também, como tonofilamentos que se tornam parte da queratina (CORMACK, 1991).

A formação das proteínas da queratina fazem parte de um processo sistemático de diferenciação celular que transforma as células epidérmicas altamente funcionais em células estruturalmente estáveis cornificadas, isto é, mortas, sem atividade metabólica, conectadas pela substância cimentante intercelular (TOMLINSON *et al.*, 2004). Esta substância determina a qualidade e as propriedades dos epitélios cornificados em nível extracelular, provendo a adesão entre as células (MÜLLING *et al.*, 1999). Os grânulos que recobrem a membrana celular contém este material que é produzido pelos queratinócitos. Após a exocitose da substância cimentante no espaço intercelular a porção glicoprotéica determina a adesão entre as células. Para a estabilidade mecânica da conexão entre as células é necessário um espaço, intercelular reduzido. Quando ocorre disqueratose há aumento da produção, desta substância e conseqüentemente aumento dos espaços intercelulares (MÜLLING *et al.*, 1999).

O processo de queratinização a rigor resulta da degeneração e morte das células epiteliais, entretanto investigações histológicas, bioquímicas e por biologia molecular têm demonstrado que a queratina é formada através de um processo

altamente específico que resulta na produção de proteínas com determinadas propriedades químicas e físicas (TOMLINSON *et al.*, 2004). Durante o processo de queratinização as células requerem um suprimento balanceado de nutrientes como aminoácidos, especialmente os que contêm enxofre como cistina, histidina e metionina, ácidos graxos, como linoleico, e aracdônico, minerais, em particular o cálcio e, também, os elementos traço como zinco e vitaminas como a biotina (MULLING *et al.*, 1999).

A queratinização envolve um processo contínuo de substituição do conteúdo celular por proteínas de queratina, organização macromolecular em tonofilamentos e subsequente incorporação de filamentos intermediários ligados a proteínas ao citoesqueleto. As queratinas são classificadas em queratina dura e queratina mole correspondendo, aparentemente, a dois diferentes modos de biossíntese (TOMLINSON *et al.*, 2004).

Tipicamente, na queratina mole os filamentos protéicos e os filamentos intermediários associados à proteína têm baixo grau de consolidação, o que permite a descamação tecidual. Quimicamente na queratina mole o conteúdo em enxofre é em torno de 1%. A queratina mole está presente na maior parte da epiderme e membranas mucosas que são queratinizadas como o esôfago e pré-estômagos dos ruminantes (BANKS, 1992).

A queratina dura difere da mole pelo alto conteúdo em enxofre apresentando mais de 5% na forma de cisteína combinada (TOMLINSON *et al.*, 2004). A formação da queratina dura envolve uma transição constante de células epidérmicas vivas, sem a formação de grânulos de queratoialina (CORMACK, 1991). A transição desde a camada germinativa até o produto final endurecido é mais gradual formando-se uma estrutura mais aderida e com alta força de tensão. A presença de constituintes não protéicos como lipídios e glicogênio é muito baixa na queratina dura (TOMLINSON *et al.*, 2004). A queratina dura ocorre em chifres, cascos, pêlos e papilas filiformes da língua e, também, nas penas das aves (BANKS, 1992).

A superfície dorsal da língua dos mamíferos é recoberta por um denso tapete de papilas filiformes. A forma e o tamanho dessas papilas variam consideravelmente entre as espécies. No homem tem sido demonstrado que os filamentos de pré-queratina, que são os principais constituintes da arquitetura do citoesqueleto (BLOOR *et al.*, 2003), servem como excelentes marcadores para as

várias vias de diferenciação epitelial e têm sido usadas para identificar as populações de queratinócitos dentro do epitélio da língua (MANABE *et al.*, 1999). Aproximadamente 20 tipos diferentes de citoqueratinas têm sido identificados e são classificados e numerados de acordo com seu peso molecular e ponto isoelétrico (PINKUS *et al.*, 1985). O Ki 67, antígeno nuclear (MIB1) marca uma proteína presente em todas as fases do ciclo celular, menos na fase G0, tendo uma relação direta com a fração de crescimento de uma população celular. Em IHQ, este é o melhor marcador de proliferação celular atualmente disponível (ALVES *et al.*, 1999).

No homem tem sido demonstrado através de reação IHQ, que o epitélio da superfície dorsal da língua é dividido em três diferentes padrões de expressão celular. Anticorpo anti-queratina esofágica AE8 reagiu com o epitélio não queratinizado entre as papilas filiformes, o AE20 demonstrou imuno-reatividade para as células da base das papilas indicando a presença de queratina presente na pele (K1) e AE13, anticorpo anti-queratina do pêlo, reagiu somente com as células justapostas às papilas cornificadas adjacentes às células imunomarcadas com anticorpo AE20 (MANABE *et al.*, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo da patogenia da intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* foram utilizados 4 bovinos da raça Jersey com 9-10 meses de idade. O cogumelo foi colhido diariamente nos meses de março, abril e maio, em bosques de eucaliptos (Figura 1A e B), localizados próximos a Faculdade de Veterinária da UFPel, e administrado aos bovinos experimentais imediatamente após a coleta.

A dose diária do cogumelo administrada, em torno de 20g/kg de peso vivo, era triturada com água em liquidificador e administrada através de sonda orogástrica, a cada bovino conforme a Tabela 1. Antes da administração os animais eram submetidos a exame clínico geral verificando-se a frequência cardíaca, movimentos respiratórios, temperatura retal e movimentos ruminais. Eram examinados, também, os cascos, a língua e os pêlos da cauda. Após a administração do cogumelo os animais permaneciam em potreiro de campo nativo e recebiam ração comercial para bovinos (1% do peso corporal por dia) e água *ad libitum*. Um bovino foi utilizado como controle, permanecendo no mesmo local e nas mesmas condições dos animais experimentais. Os bovinos 2 e 3 receberam o cogumelo durante 3 dias consecutivos, havendo um intervalo de 3 dias para o reinício da administração devido às intensas chuvas que ocorreram no período do experimento e que impediram a coleta do cogumelo.

Os três bovinos experimentais foram sacrificados aos 8 e 15 dias do início da administração do cogumelo (Tabela 1). O bovino utilizado como controle foi sacrificado aos 15 dias do início do experimento. Os bovinos foram necropsiados e fragmentos de cauda e língua foram fixados em formalina tamponada a 10%, por 48 a 72 horas. Amostras dos cascos dos três bovinos e o controle foram cortadas conforme a Figura 2 para observação histológica das estruturas mostradas na Figura 3, sendo fixadas, também, em formalina tamponada a 10%. Estes e demais tecidos colhidos, incluindo o sistema nervoso central, foram processados rotineiramente para estudo histológico das lesões.

Amostras selecionadas da língua dos três bovinos intoxicados e do bovino controle foram processadas rotineiramente para a realização da técnica de

imunohistoquímica (IHQ)¹. Para a imunomarcação de citoqueratina, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-(pan)citoqueratina bovina produzido em coelho (DakoCytomation – Código Z0622, diluição 1:2000) e para marcação de proliferação celular foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti-Ki-67 (Mib-1; Biogenex; diluição 1:400). Cortes histológicos de 3 µm em lâminas silanizadas foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 min. A recuperação antigênica foi realizada em forno microondas com TRIS-EDTA (pH 9,0) por 10 min. A avidina endógena foi bloqueada com solução de clara de ovo (uma clara diluída em 100ml de água destilada) por 15 min e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com leite em pó desnatado a 5% em PBS por 30 min. A incubação com o anticorpo primário, diluído em diluente de anticorpo (DAKO Antibody Diluent – Código S3022), foi “overnight” em câmara úmida. As seções foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado (Dako LSAB + Kit-Peroxidase – Código K0690) por 35 min em temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com complexo Estreptavidina-peroxidase (Dako LSAB + Kit-Peroxidase – Código K0690) por 35 min em temperatura ambiente. As lavagens entre as principais etapas foram realizadas com PBS pH 7,0. A revelação foi executada com DAB. As seções foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 min, desidratadas em álcool e montadas em lamínula com resina sintética.

Para o estudo ultra-estrutural, fragmentos da língua (porção ântero-dorsal) foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio, desidratados em uma série crescente de etanóis e incluídos em Epon. Os cortes semi-finos foram corados por azul de metileno. Em áreas selecionadas dos blocos foram feitos cortes ultra-finos contrastados por acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão.

¹ Técnicas realizadas no Departamento de Patologia, laboratório de Patologia Veterinária – LPV, UFSM

Tabela 1. Intoxicação experimental por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos. Dados referentes aos animais e ao experimento.

Bovino	Peso	Total de cogumelo administrado	Dose total g/kg	Nº de administrações	Eutanásia
1	85 kg	11,950 kg	140g/kg	7	8 dias
2*	88 kg	23,600kg	268g/kg	13	15 dias
3*	91 kg	23,840 kg	261g/kg	13	15 dias
4	90 kg	-	-	-	15 dias

* Estes bovinos receberam o cogumelo durante 3 dias suspendendo-se a administração por 3 dias de intensa chuva em que não foi possível a colheita do cogumelo, após os quais retornou-se a administração até completar os 13 dias.

4 RESULTADOS

4.1 Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados nos três bovinos utilizados neste experimento caracterizaram-se por apatia seguida de anorexia, hiperemia da mucosa oral, alisamento da superfície dorsal da língua e queda dos pêlos longos da cauda quando levemente tracionados. No bovino nº 1 estes sinais foram observados entre quatro e seis dias após o início do experimento, observando-se, ainda, secreção nasal serosa e sialorréia. Sete dias após o início do experimento este bovino apresentou dificuldade de manter-se em estação, permanecendo em decúbito lateral ou esternal (Figura 4) por longos períodos e levantava-se somente quando forçado. Nos bovinos nº 2 e nº 3 os sinais eram mais discretos, observando-se alisamento da língua e perda dos pêlos da cauda, à leve tração (Figura 5), quatro a seis dias após o início do experimento.

O bovino nº 1 apresentou, ainda, acentuada perda de peso durante o período experimental. No exame clínico não foram observadas alterações nas frequências cardíaca e respiratória ou movimentos ruminais de nenhum dos três bovinos utilizados.

4. 2 Patologia

Não foram observadas lesões macroscópicas em nenhum dos três animais experimentais, além da superfície dorsal da língua com atenuação das papilas filiformes e desaparecimento das papilas lentiformes e no bovino nº1 área de erosão no ápice da mesma (Figuras 6A e B).

Histologicamente no bovino nº 1 observou-se o epitélio da superfície dorsal da língua estreito com ausência das papilas filiformes (Figura 7A e B). O epitélio superficial apresentava vacuolização dos queratinócitos e havia retenção de núcleos na camada superficial de queratina que estava também, vacuolizada (Figura 8 e 9). Essas lesões eram observadas principalmente na base das papilas filiformes. Em algumas áreas havia, também, espongiose no estrato basal e disqueratose (Figura 10). Na submucosa adjacente ao epitélio havia discreto infiltrado inflamatório multifocal de células mononucleares. Nos bovinos nº 2 e nº 3 observou-se que apenas o epitélio da superfície dorsal da língua era mais estreito que o do bovino controle e que as papilas filiformes apresentavam o estrato córneo atenuado e sem a forma característica de espinho de roseira (Figura 11A e B).

As lesões histológicas observadas na região laminar do casco do bovino nº 1 caracterizaram-se por vacuolização da epiderme laminar com hiperplasia de queratinócitos e queratinização irregular e flocular (Figura 12). Nos bovinos nº 2 e nº 3 as lesões eram mais discretas observando-se apenas vacuolização dos queratinócitos das lâminas epidérmicas.

Na pele da cauda do bovino nº 1 observou-se hiperqueratose ortoqueratótica, (Figura 13). Alguns folículos apresentavam vacuolização da bainha radicular externa e espessamento da queratina tricolemal ao redor da haste do pêlo e infiltrado inflamatório mononuclear ao redor dos folículos (Figura 14A e B).

No estudo imunohistoquímico para marcação de proliferação celular utilizando o antígeno Ki 67, não foram observadas diferenças entre o epitélio da superfície dorsal da língua dos três bovinos intoxicados e o do bovino controle. Em 10 campos de maior aumento a média de núcleos marcados positivamente para Ki-67 no controle foi de 46,7 e no bovino nº 1 foi de 47 (Figura 15A e B). Utilizando o anticorpo policlonal anti-pancitoqueratina bovina não foram, também, observadas diferenças na marcação entre o epitélio dorsal da língua dos bovinos intoxicados e o controle (Figuras 16 A, B e C).

No estudo por microscopia eletrônica observou-se que, na camada espinhosa do epitélio da língua, os queratinócitos exibiam diminuição dos tonofilamentos (Figura 17) quando comparados com os queratinócitos da mesma camada na língua do bovino controle (Figura 18). Os desmossomos estavam bem conservados e os espaços intercelulares estavam acentuadamente dilatados (Figura 17).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que doses em torno de 140g/kg de peso vivo, administradas em doses diárias de aproximadamente 20g/kg durante 7 dias, de *Ramaria flavo-brunnescens* provocaram a intoxicação em bovinos. Deve-se considerar, entretanto, que no quarto dia do experimento os animais já apresentavam sinais clínicos, indicando que 80g/kg de peso vivo são suficientes para provocar as lesões iniciais. Em intoxicações experimentais realizadas anteriormente a dose mínima que causou sinais clínicos da intoxicação foi de 5g/kg de peso vivo durante cinco dias, perfazendo um total de 25 g/kg de peso vivo (SANTOS *et al.*, 1975). Em outro estudo os sinais clínicos da doença foram observados quando os animais haviam ingerido em torno de 80g/kg de peso vivo (KOMMERS & SANTOS, 1995). Estas diferenças são explicadas, provavelmente, pela variação na toxicidade do cogumelo previamente demonstrada (SALLIS *et al.*, 2000) e, também, pela susceptibilidade individual dos animais ao princípio tóxico do mesmo.

A utilização de bovinos para a reprodução experimental da intoxicação foi realizada em função de que apesar de cobaios serem, aparentemente sensíveis, as lesões descritas são inflamatórias e diferem das lesões iniciais observadas nos bovinos deste experimento. Além disso, em outro experimento foi sugerido que as lesões observadas nos cobaios poderiam ser devidas a trauma induzido pela sonda utilizada na administração do cogumelo (RAFFI & SCHILD, 2000. Dados não publicados).

Ainda com relação à variação na toxicidade de *R. flavo-brunnescens*, chama a atenção que os bovinos nº 2 e nº 3 apresentaram sinais clínicos e lesões macroscópicas e histológicas mais discretas apesar de terem ingerido uma quantidade maior do cogumelo por um período mais prolongado de tempo. Isto pode

ser explicado pelo fato de que estes dois bovinos receberam *R. flavo-brunnescens* após um forte temporal que ocorreu no município de Capão do Leão-RS durante um período de 3 dias consecutivos. Quando o cogumelo voltou a ser colhido para a administração estava com coloração acastanhada ou amarelo-claro e mais mole, apresentando início de deterioração. Tem sido demonstrado que o princípio ativo deste cogumelo é bastante volátil (SALLIS *et al.*, 1993; KOMMERS & SANTOS, 1995), e no presente experimento é provável que tenha perdido parte de sua toxicidade devido ao excesso de chuva ocorrido no período do experimento.

No presente trabalho, aparentemente, foram produzidas as lesões iniciais da intoxicação, caracterizadas principalmente por alisamento da língua, aumento da temperatura do casco e sinais de dor evidenciados pelo decúbito prolongado dos animais. Observou-se, além disso, que através da tração delicada era possível retirar os pêlos da cauda dos animais, embora não tenha sido observada a perda espontânea dos mesmos. Em casos naturais da intoxicação pelo cogumelo o alisamento da língua com atrofia das papilas filiformes é um achado constante (BARROS, 1958; BAUER *et al.*, 1966; FREITAS *et al.*, 1966; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; SANTOS *et al.*, 1975; PASCHOAL *et al.*, 1983; RIET-CORREA *et al.*, 1985; SCHILD *et al.*, 1996; BARROS *et al.*, 2006). O adelgaçamento da superfície dorsal da língua foi notável no bovino nº 1 (Figura 7) e observado, também, nos bovinos nº 2 e nº 3 deste experimento. Esta é, sem dúvida, a lesão inicial que ocorre na intoxicação por este cogumelo, manifestando-se por sialorréia abundante, descrita na maioria dos relatos da intoxicação espontânea e experimental (RIET-CORREA *et al.*, 1985; KOMMERS & SANTOS, 1995; SCHILD *et al.*, 1996; BARROS *et al.*, 2006).

As lesões histológicas observadas na língua dos animais deste experimento, caracterizadas pela vacuolização dos queratinócitos e desprendimento da superfície queratinizada, principalmente na base das papilas filiformes, são similares às descritas anteriormente em trabalhos experimentais de intoxicação em bovinos (KOMMERS, 1993; KOMMERS & SANTOS 1995). Aparentemente, as papilas filiformes linguais são a primeira estrutura a ser afetada pelo princípio ativo do cogumelo, entretanto as lesões estendem-se por todo o epitélio da superfície dorsal da língua, o que demonstra que o princípio tóxico tem um efeito não apenas sobre as estruturas que sofrem queratinização dura. Apesar de que não foram observadas lesões no esôfago e pré-estômagos nos animais deste experimento, lesões

ulcerativas no epitélio queratinizado destas regiões do tubo digestivo, têm sido descritas em casos espontâneos da intoxicação (BAUER *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 1975; QUIÑONES-SOWERBY, 1973; SCHILD *et al.*, 1996; BARROS *et al.*, 2006).

Nos cascos e nos folículos pilosos da pele da cauda as lesões observadas, principalmente no bovino nº 1 deste experimento foram semelhantes às descritas em intoxicações experimentais por *Ramaria flavo-brunescens* realizadas em bovinos (KOMMERS, 1993; KOMMERS & SANTOS, 1995) e, também, em casos naturais da intoxicação descritos nesta espécie animal (BARROS *et al.*, 2006).

A técnica de imunoistoquímica realizada utilizando o anticorpo policlonal anti-pancitoqueratina bovina não demonstrou diferenças entre o epitélio dorsal da língua dos bovinos intoxicados e o do bovino controle. Deve considerar-se que há aproximadamente 20 tipos diferentes de citoqueratinas (PINKUS *et al.*, 1985), e que os possíveis distúrbios na queratinização observados nos cortes histológicos, provavelmente, necessitem marcadores para tipos específicos de citoqueratina nas áreas afetadas. No homem tem sido demonstrado que as diferentes regiões do epitélio da língua apresentam distintos padrões de expressão das queratinas (MANABE *et al.*, 1999). Com a utilização do anticorpo Ki 67, antígeno nuclear (MIB1), do mesmo modo, não foram observadas diferenças no número de queratinócitos marcados na camada basal do epitélio da superfície dorsal da língua entre os bovinos experimentais e o bovino controle. Isto poderia sugerir que o princípio tóxico de *Ramaria flavo-brunescens* não atua na proliferação celular e que o marcado desgaste que ocorre no epitélio dorsal da língua se dá em consequência da ação do princípio tóxico sobre os queratinócitos das camadas superficiais do epitélio queratinizado. Ou seja, não há lesão nas células da camada basal onde ocorre a proliferação celular, já que este anticorpo marca uma proteína presente em todas as fases do ciclo celular, tendo uma relação direta com a fração de crescimento de uma população de células (ALVES *et al.*, 1999). Por outro lado, Kommers (1993) observou em seus experimentos marcada diminuição nas camadas de queratinócitos do epitélio da língua sugerindo interferência na divisão celular do extrato germinativo. Para confirmar os resultados obtidos no presente experimento seria necessário um número maior de bovinos experimentais.

Os resultados obtidos através da microscopia eletrônica sugerem, do mesmo modo, que o princípio tóxico deste cogumelo atuaria principalmente sobre o

processo de queratinização envolvendo os tonofilamentos dos queratinócitos da camada espinhosa, que estão diminuídos em relação aos tonofilamentos presentes nos queratinócitos do bovino controle. Esta diminuição contribui para o aumento dos espaços intercelulares observados facilitando a diminuição da adesão entre as células cornificadas e posterior desprendimento.

O processo de queratinização normal envolve um suprimento balanceado de nutrientes como aminoácidos, especialmente os que contêm enxofre, ácidos graxos, minerais e, também, os elementos traço como zinco e vitaminas como a biotina (MÜLLING *et al.*, 1999). Em um estudo das estruturas do casco de bovinos sob condições de deficiências nutricionais foi observado que, além da importância dos aminoácidos ricos em enxofre na formação da queratina dura, a deficiência de biotina causou alterações qualitativas e quantitativas na síntese dos filamentos de queratina (MÜLLING *et al.*, 2004). Kommers & Santos (1995) sugeriram que o princípio ativo do cogumelo interferiria no metabolismo dos aminoácidos sulfurados resultando no enfraquecimento da estrutura molecular da queratina dura por deficiência de enxofre, levando à queda dos cascos, dos pêlos da extremidade da cauda, dos chifres e ao desaparecimento das papilas filiformes linguais. Aparentemente neste trabalho os resultados obtidos reforçam a hipótese de ação do princípio tóxico de *R. flavo-brunnescens* sobre os aminoácido sulfurados que compõe principalmente a queratina dura.

Por outro lado SALLIS *et al.* (2000) estudando a intoxicação em ovinos sugeriram que as lesões seriam consequência do espessamento da musculatura das paredes dos vasos (miopaquines), degeneração endotelial e trombose das arteríolas dérmicas da submucosa da língua e do córion laminar do casco, causando lesões similares ao que ocorre no ergotismo. Em um surto ocorrido em búfalos os autores observaram necrose da ponta das orelhas e da cauda o que sugeriu, também, lesões similares ao ergotismo (ROZZA *et al.*, 2004). Nos bovinos desse experimento não foram observadas lesões vasculares como as descritas em ovinos.

Em um surto espontâneo da intoxicação, em bovinos, ocorrido na região central do RS, foram encontradas lesões de malacia focal simétrica no bulbo na altura do óbex (BARROS *et al.*, 2006). Esta lesão não foi observada nos bovinos deste trabalho. Tampouco foram observados sinais clínicos que indicassem alguma lesão no sistema nervoso central. Aparentemente a dose do cogumelo ingerida pelos bovinos não foi suficiente para causar estas lesões.

6. CONCLUSÕES

1. *Ramaria flavo-brunnescens* provocou nas condições deste experimento sinais clínicos em bovinos em doses de 80g/kg de peso vivo administradas em doses diárias de 20g/kg de peso vivo.
2. As lesões iniciais ocorrem nas estruturas que sofrem queratinização dura como as papilas filiformes da língua, o epitélio laminar dos cascos e os folículos pilosos da pele da cauda.
3. As lesões histológicas iniciais da intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* no epitélio da superfície dorsal da língua caracterizam-se por vacuolização dos queratinócitos da camada espinhosa, disqueratose e desprendimento da camada córnea.
4. O princípio tóxico de *Ramaria flavo-brunnescens* nas condições deste experimento atua sobre as camadas superficiais dos epitélios queratinizados não afetando a proliferação celular.
5. As lesões ultraestruturais caracterizam-se por diminuição dos tonofilamentos dos queratinócitos da camada espinhosa do epitélio e aumento dos espaços intercelulares.

7 REFERÊNCIAS

ALVES V.A.F.; BACCHI C.E.; VASSALLO J. Manual de imuno-histoquímica. Soc. Bras. de Patol., São Paulo, 270 p., 1999.

BANKS W.J. Histologia Veterinária Aplicada. 2º ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, 627p. 1992.

BARROS S.S. 1958. Da possível incidência da toxicose pelo selênio em bovinos no Rio Grande do Sul. Dipan, Porto Alegre, 11:10-13.

Barros R.R. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae). Dissertação de mestrado. Santa Maria, RS. 53p.

BARROS R.R.; IRIGOYEN L.F.; KOMMERS G. D.; RECH R. R.; FIGHERA R. A.; BARROS C.S.L. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae) em bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. (No prelo), 2006.

BAUER A.G.; LARANJA R.J.; SANTOS A.G. Sobre a etiologia do chamado “mal do eucalipto”. Arq. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre, 3, p.85-90,1966.

BLOOR B.K.; TIDMAN N.; LEIGH I.M.; ODELL E.; DOGAN B.; WOLLINA V.; CHALI L.; WASSEEM A. Expression of keratin K₂ in cutaneous and oral lesions. Association with keratinocyte activation, proliferation and keratinization. American Journal of Pathology, v. 162, p. 963-975, 2003

CORMACK D.H.; Ham Histologia. 9º ed. Rio de Janeiro - Brasil: Guanabara & Koogan, p. 01-555, 1991.

EISCHTAEDT O.; RAFFI M.B.; GARCIA D. Intoxicação experimental em cobaios por *Ramaria flavo-brunnescens*. Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico. Editora Universitária, UFPel, v. 20, p. 71-74, 2000.

FIDALGO O.; FIDALGO M.E.P.K. A poisonous *Ramaria* from southern Brazil. Rickia, USA, v.5 p. 71-91. 1970.

FREITAS J.; PASTURINO C.L.; QUIÑONES-SOWERBY C.A.; BELLAGAMBA C.; GIAMBRUNO E.; INFANTOZZI J.M.; DECIA J.C.; GERVENANZKY. "Comunicacion sobre uma enfermedad aparecida em ganados del Uruguay em los últimos años (BOCOPA)" 5º Congresso Panamericano de Medicina. Veterinaria Y Zootecnia, Caracas, p. 152- 159, 1966.

KOMMERS G.D. Intoxicação experimental por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae) em bovinos: estudo da patogenia das lesões dos cascos, cauda, chifres e língua. Dissertação de Mestrado, Santa Maria, RS, 1993.

KOMMERS G.D.; SANTOS M.N. Experimental poisoning of cattle by the mushroom *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae): A study of the morphology and pathogenesis of lesions in hooves, tail, horns and tongue. Veterinary and Human Toxicology, v. 37, n 4, p. 297-302, 1995.

MAGALHÃES H.M.; BOELTER R.; TRINDADE D.B. DL 50 extrato aquoso do fungo *Ramaria flavo-brunnescens* para camundongos. Centro de Ciências Rurais. v. 5, n 2, p. 131-134, 1975.

MANABE M.; LIM W. H.; WINZER M.; LOOMIS C.A. Architectural organization of filiform papillae in normal and black hairy tongue epithelium. Dissection of differentiation pathways in a complex human epithelium according to their patterns of keratin expression. Arch. Dermatol, v. 135, p. 177-180, 1999.

MÜLLING K.W.; BRAGULLA H.H.; REESE S.; BUDRAS D.; STEINBERG W. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. Anal. Histol. Embryol, v. 28, p. 103-108,1999.

O'TOOLE D. & RAISBECK M. F. Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. J. Vet. Diagn. Invest. v. 7, p. 364-373, 1995.

PASCHOAL J.P.; PORTUGAL M.A.S.C.; NAZÁRIO W. Ocorrência do “mal do eucalipto” em bovinos no estado de São Paulo. Biológico, v.49(1), p. 15-18,1983.

PERUSIA O.R.; RODRIGUEZ-ARMESTO R. Plantas tóxicas y micotoxinas. Esperanza, Santa fé, Argentina, 94p.1992.

PINKUS G.S.; CONNOR E.M.; ETHERIDGE C.L.; CORSON J.N. Optimal immunoreactivity of keratin proteínas in formalin-fixed, parafin embedded tissue requires preliminary trypsinization. An immunoperoxidase study of various tumors using polyclonal and monoclonal antibodies. J. Histochem cytochem, v. 33(5) p. 465-73, 1985.

PRUCOLI J.O.; CAMARGO W.V.A. Intoxicação experimental em ovinos com *Clavaria* spp. Boletim Industrial Animal, Nova Odessa, v. 23, p. 177-178, 1965/66.

QUIÑONES-SOWERBY C.A. BOCOPA. Bolsa del libro de la Faculdade de Veterinária Alberto Lasplaces, Montovideo, p.1-13, 1973.

RECH R.R.; SCHILD A.L.; DRIEMEIER D.; GARMATZ S.L.; OLIVEIRA F.N.; RIET-CORREA F.; BARROS C.S.L. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 25, p.97-105, 2005.

RIET-CORREA F.; SCHILD A.L.; MENDEZ M.C.; OLIVEIRA J.A.; GIL-TURNE S. C.; GONÇALVES A. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* (fungo do eucalipto).

Laboratório Regional de Diagnóstico Relatório de Atividades e Doenças de Área de Influência no Período 1978/1982, Editora da Universidade, Pelotas, 54 p., 1983.

RIET-CORREA F.; SCHILD A.L.; MÉNDEZ M.C.; BROD C.S.; FERREIRA J.L.M. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos. Laboratório Regional de Diagnóstico. Doenças diagnosticadas no ano 1984, Editora Universitária, Pelotas, p. 28-29, 1985.

RIET-CORREA F. Intoxicação por *Claviceps purpurea*. In.: RIET-CORREA F.; MÉNDEZ M.C.; SCHILD A.L. Intoxicação por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. Volume I. Uruguai: Editora Agropecuária Hemisfério Sur, 1991. cap11, p. 227-239, 1991.

RIVERO R.; RIET-CORREA F.; DUTRA, F. (2000). Toxic plants and mycotoxins affecting cattle and sheep in Uruguay. World Buiatrics Congress, 21, Punta del Este, Uruguay, p.1161-1170, in CD-ROM.

ROZZA D.B.; SPAGNOL C.; SILVA E.B.; CALLADO A.K.C.; OLIVEIRA E.C.; DRIEMEIR D. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em búfalos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 24(supl), p.56-57, 2004.

SALLIS E.S.; RIET-CORREA F.; MÉNDEZ, M.C. Experimental intoxication by *Ramaria flavo-brunnescens* in sheep. Vet. J., Nova Zelândia v. 41, p. 224, 1993.

SALLIS E.S.V.; RIET-CORREA F.; RAFFI M.B.; MÉNDEZ M.C. Experimental intoxication by the Mushroom *Ramaria flavo-brunnescens* in sheep. Veterinary and Human Toxicology, v.42, n 6, p.321-324, 2000.

SALLIS E.S.V.; RAFFI M.B.; RIET-CORREA F. Intoxicação experimental em ovinos com *Ramaria flavo-brunnescens* congelada ou dessecada. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.24, n 2, p107-110,2004.

SANTOS M.N.; BARROS S.S.; BARROS C.S.L. Intoxicação em bovinos pelo cogumelo *Ramaria flavo-brunnescens*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 10, p. 105-109, 1975.

SANTOS M.N. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens*. In.: RIET-CORREA F.; MÉNDEZ M.C.; SCHILD A.L. Intoxicação por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. Volume I. Uruguai: Editora Agropecuária Hemisfério Sur, 1991. cap17, p. 309-308, 1991.

SCHILD A.L.; RIET-CORREA F.; RUAS J.L.; RIET-CORREA G.; FERNANDES C.G.; MOTTA A.; MÉNDEZ M.C.; SOARES M. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos. Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico, editora Gráfica Universitária, v. 16, p. 25-28,1996.

TOMLINSON D.J.; MÜLLING C.H.; FAKLER T.M. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. J. Dairy Sci, v. 87, p. 797-809,2004.



Figura1. A. Bosque de eucaliptos onde foi colhida *Ramaria flavo-brunnescens* para a administração aos bovinos e, no detalhe, em meio a folhas de eucalipto. B. Cogumelo em maior aumento.

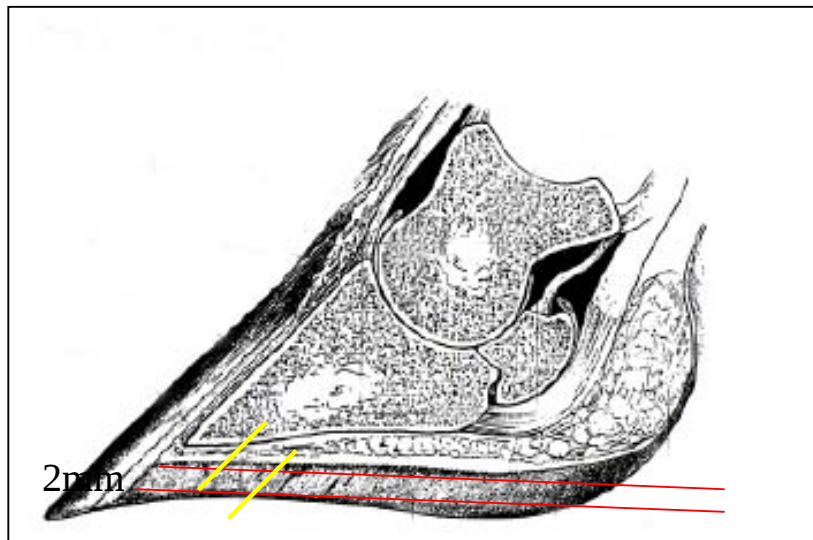


Figura 2. Corte sagital de dígito bovino. As linhas vermelhas mostram os cortes realizados no casco dos bovinos intoxicados e controle após a fixação. As linhas amarelas indicam os limites das estruturas coletadas para a microscopia e imunohistoquímica.

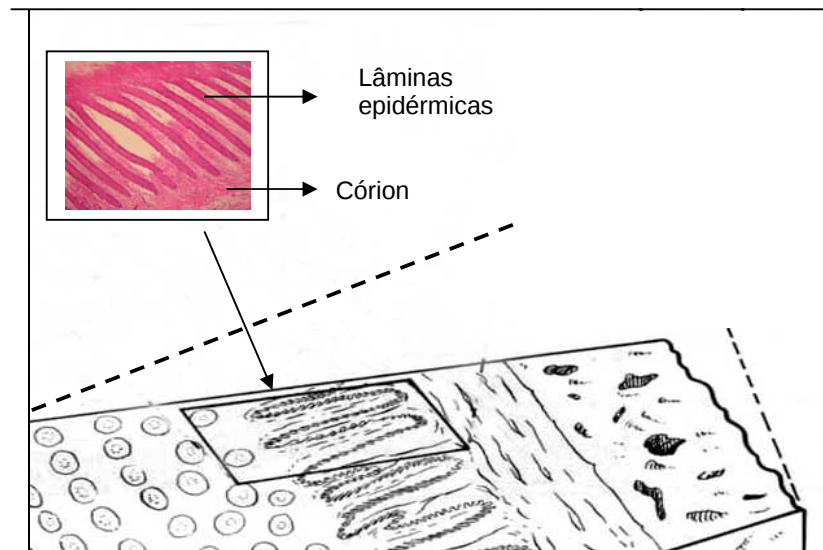


Figura 3. Estruturas laminares do casco estudadas histologicamente. No detalhe: lâminas epidérmicas e córion.



Figura 4. Bovino nº 1 intoxicado por *Ramaria flavo-brunnescens* em decúbito esternal cinco dias após o início do experimento.



Figura 5. Bovino nº 1 intoxicado por *Ramaria flavo-brunnescens*. Retirada dos pêlos longos da cauda com leve tração.

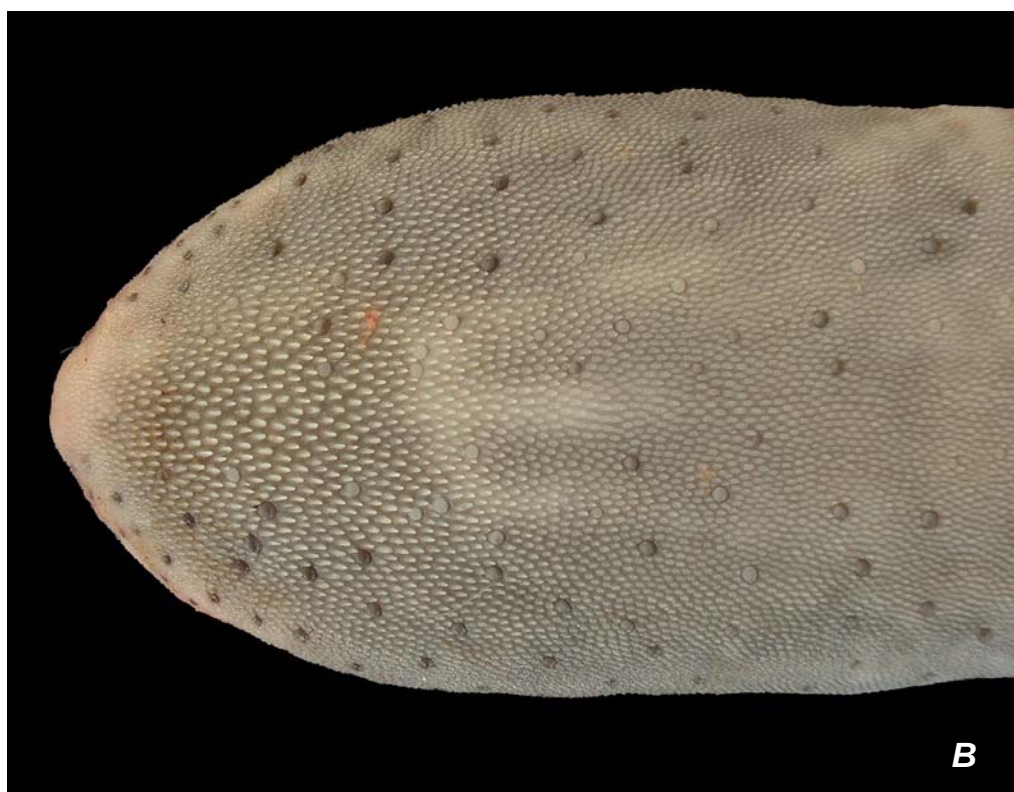


Figura 6. Bovino nº 1 intoxicado por *Ramaria flavo-brunnescens*. A. Na porção anterior da superfície da língua observa-se atenuação das papilas filiformes e alisamento principalmente nos bordos laterais, presença de erosão na região central. B. Língua de bovino controle.

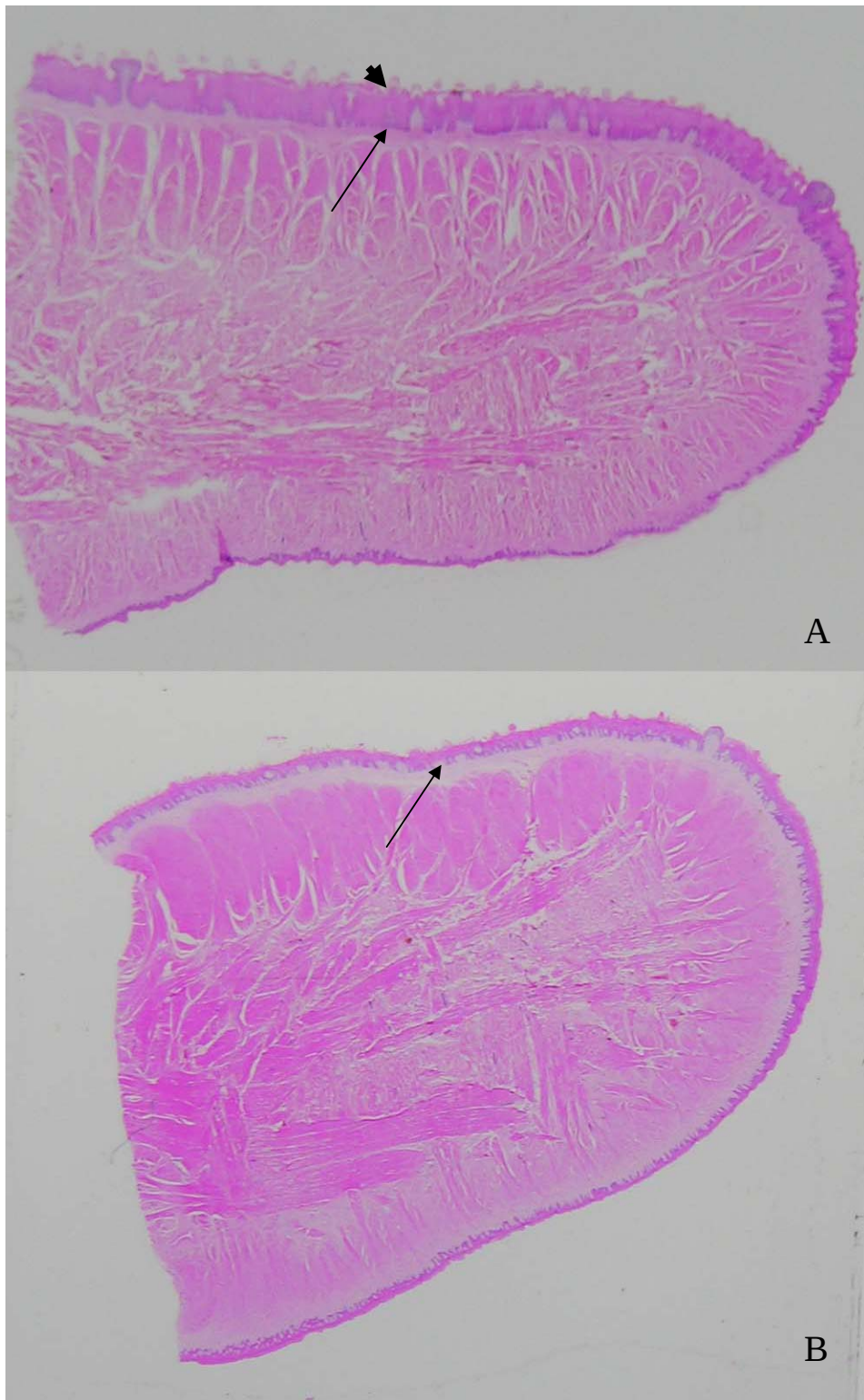


Figura 7. Língua de bovino controle (A) e bovino nº 1 (B). Observa-se marcada diferença na espessura do epitélio da superfície dorsal da língua (setas) e a presença de numerosas papilas filiformes (A) (cabeça de seta), em menor número no bovino intoxicado (B). HE, sub-macroscópica.

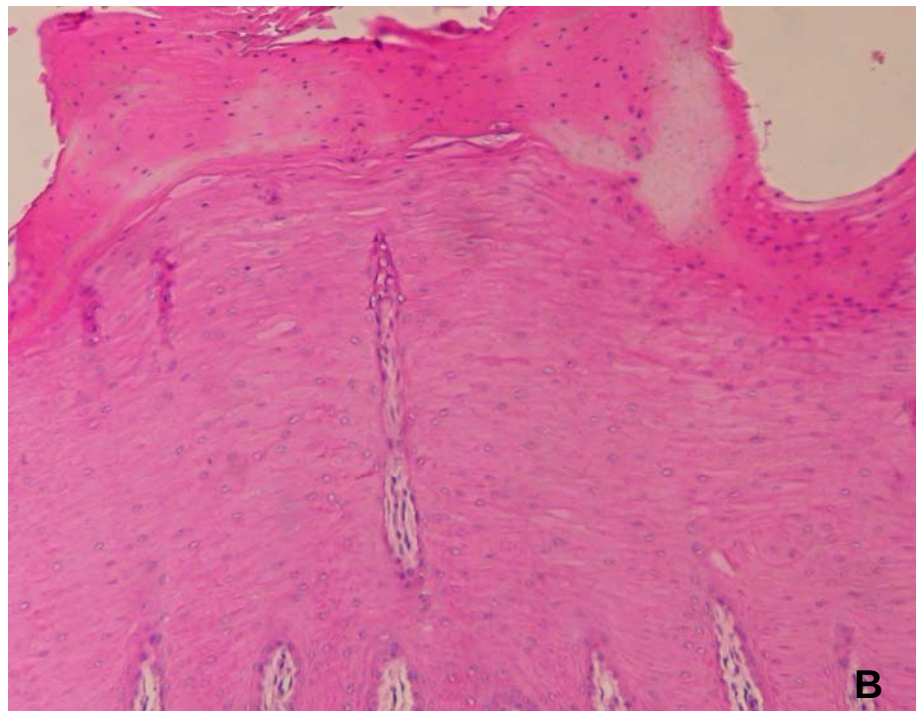
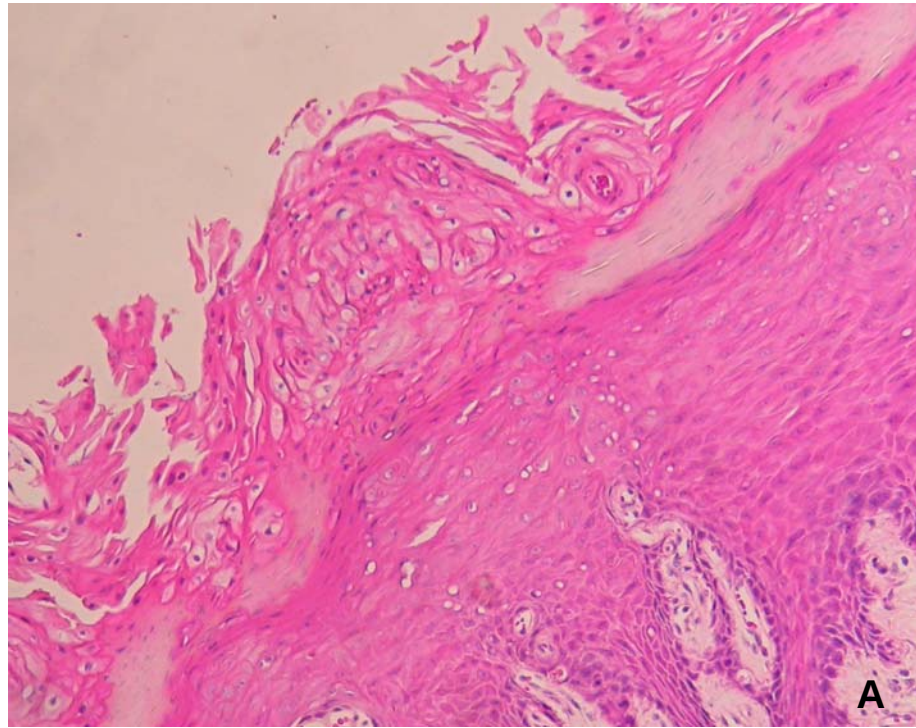


Figura 8. Epitélio da superfície dorsal da língua do bovino nº1. Observa-se epitélio estreito com vacuolização dos queratinócitos na base das papilas filiformes e descamação da camada córnea (A). Epitélio da superfície dorsal da língua de bovino controle (B). HE Obj.20x.

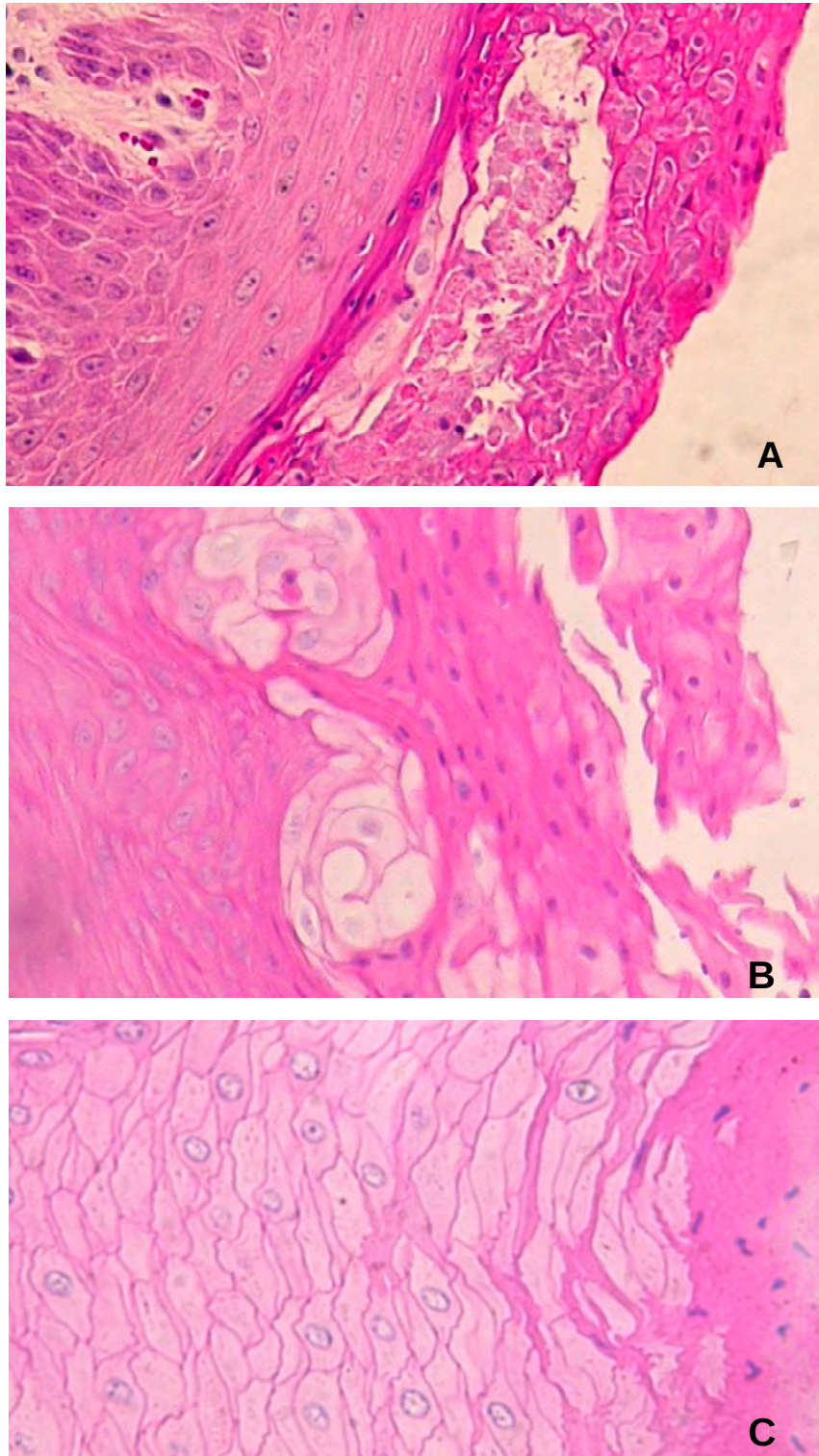


Figura 9. Epitélio da superfície dorsal da língua do bovino nº1. Observa-se estreitamento do epitélio e degeneração da camada superficial do estrato espinhoso (A) e vacuolização dos queratinócitos (B). Epitélio da língua de bovino controle com queratinização normal (C). (HE Obj.40x).

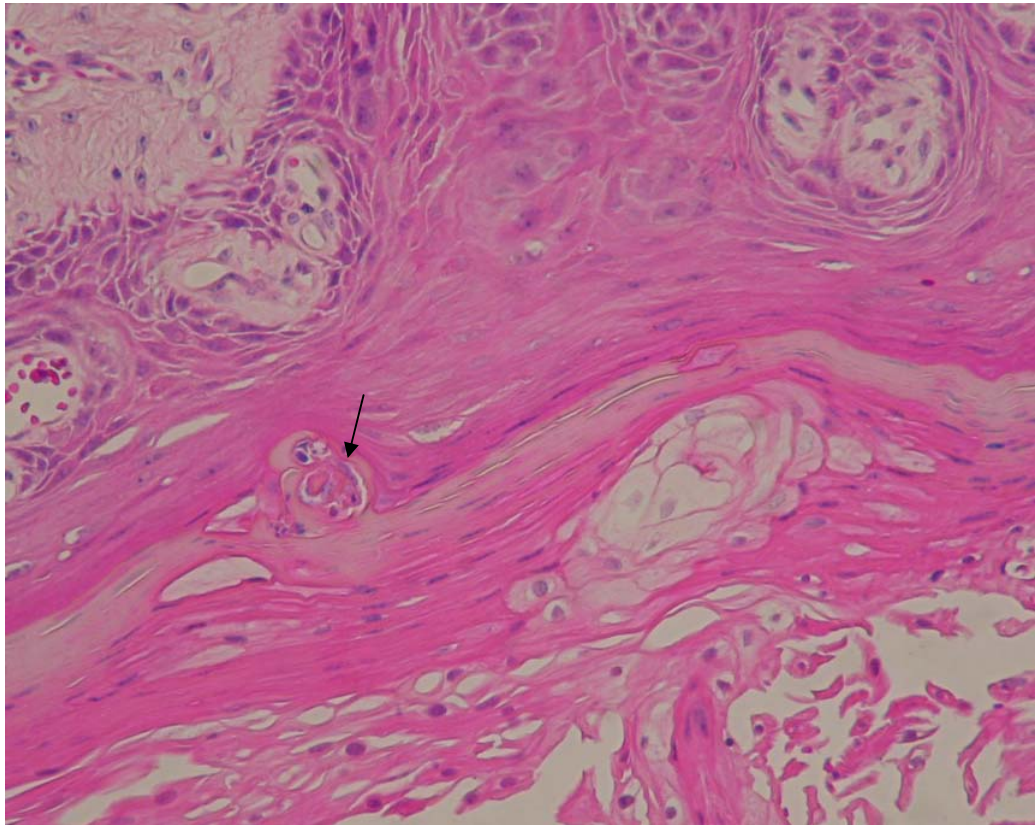


Figura 10. Língua do bovino nº 1. Observa-se espongiose no estrato basal, disqueratose (seta), vacuolização dos queratinócitos e desprendimento da camada queratinizada do epitélio. (HE Obj.20X)

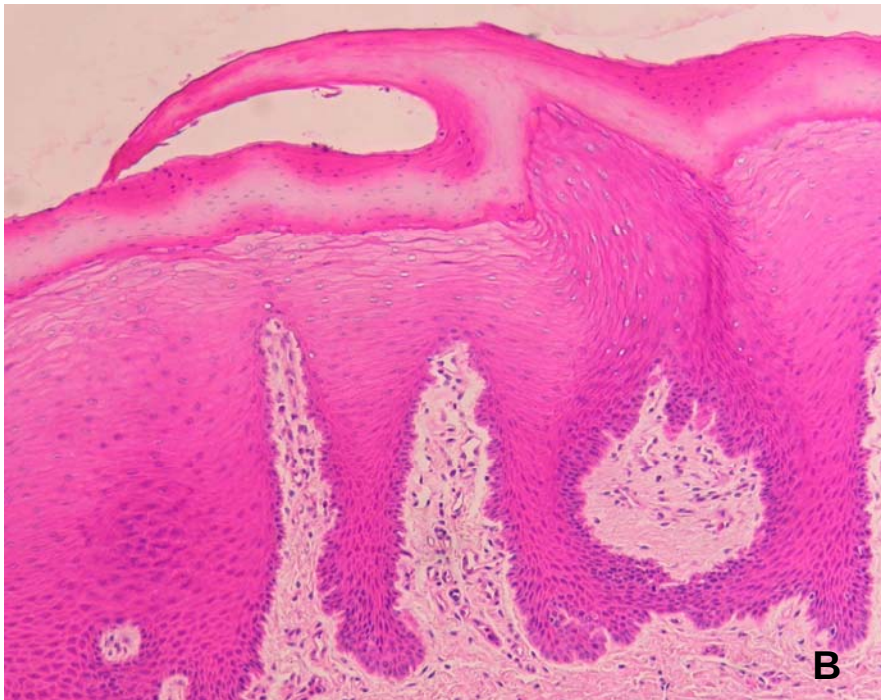
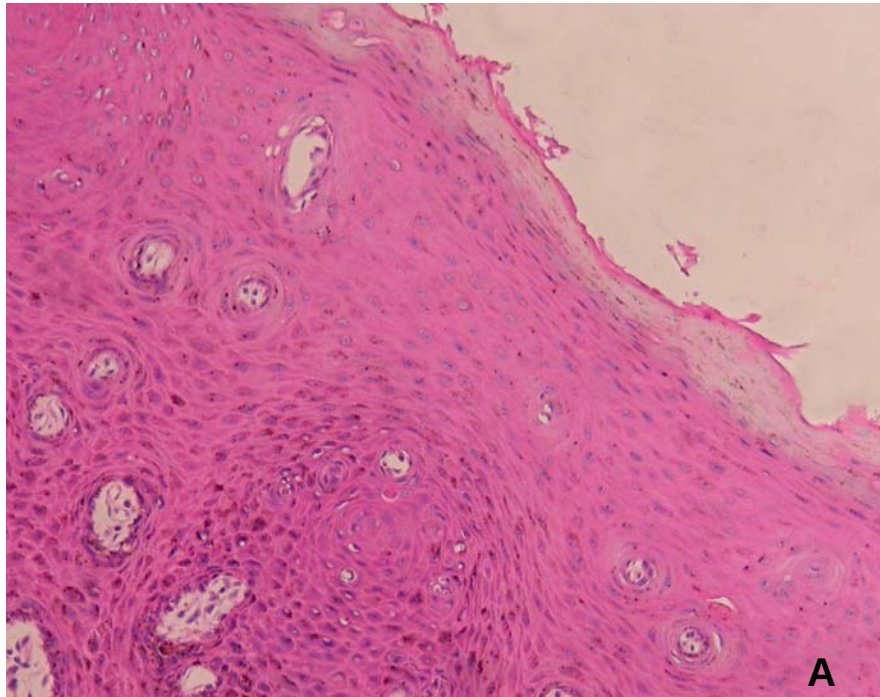


Figura 11. Epitélio da superfície dorsal da língua do bovino nº 3. Observa-se atenuação da camada de queratina (A). Epitélio da língua de bovino controle mostrando a aparência normal das papilas filiformes (B). (HE Obj.10x).

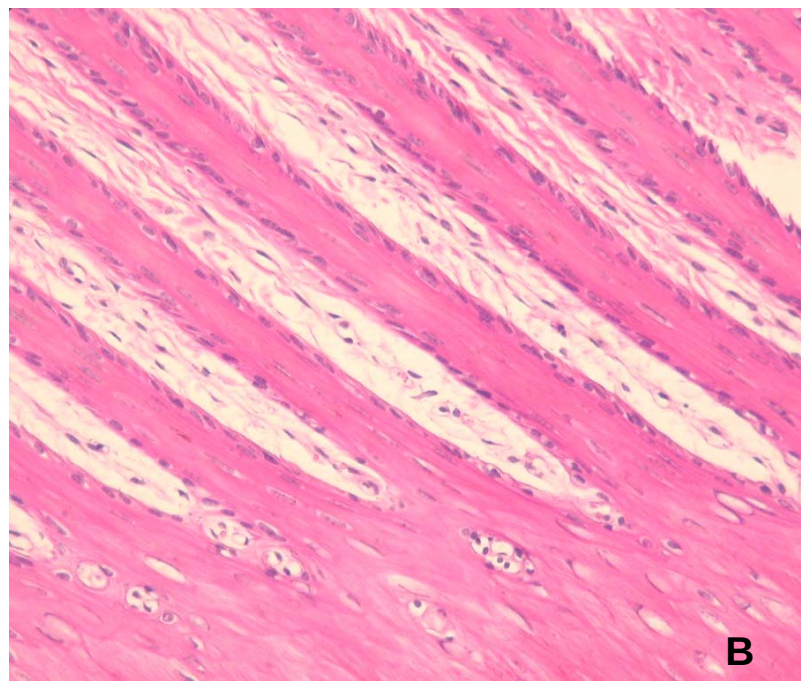
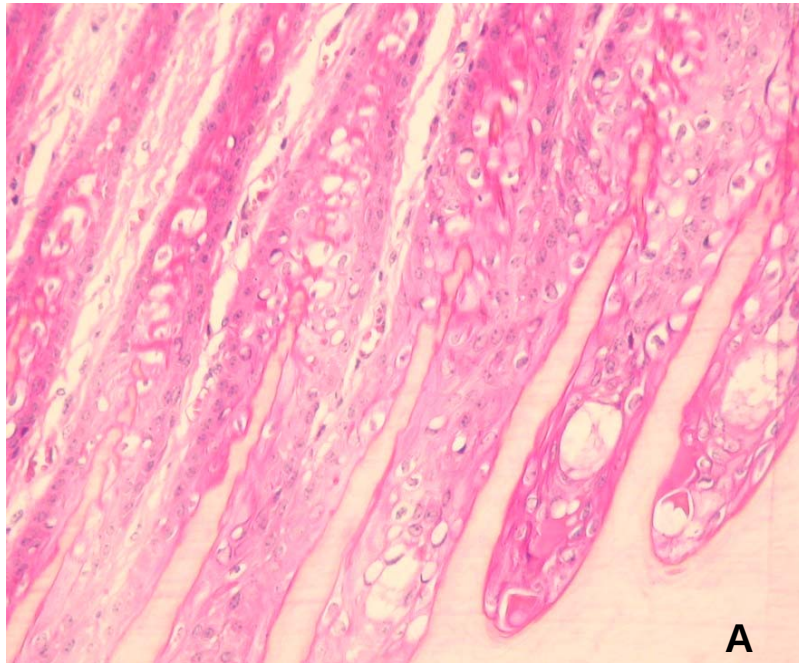


Figura 12. Casco do bovino nº 1. Observa-se degeneração dos queratinócitos das lâminas epidérmicas com queratinização flocular (A). Lâminas epidérmicas do casco de bovino controle (B). (HE Obj.20X)

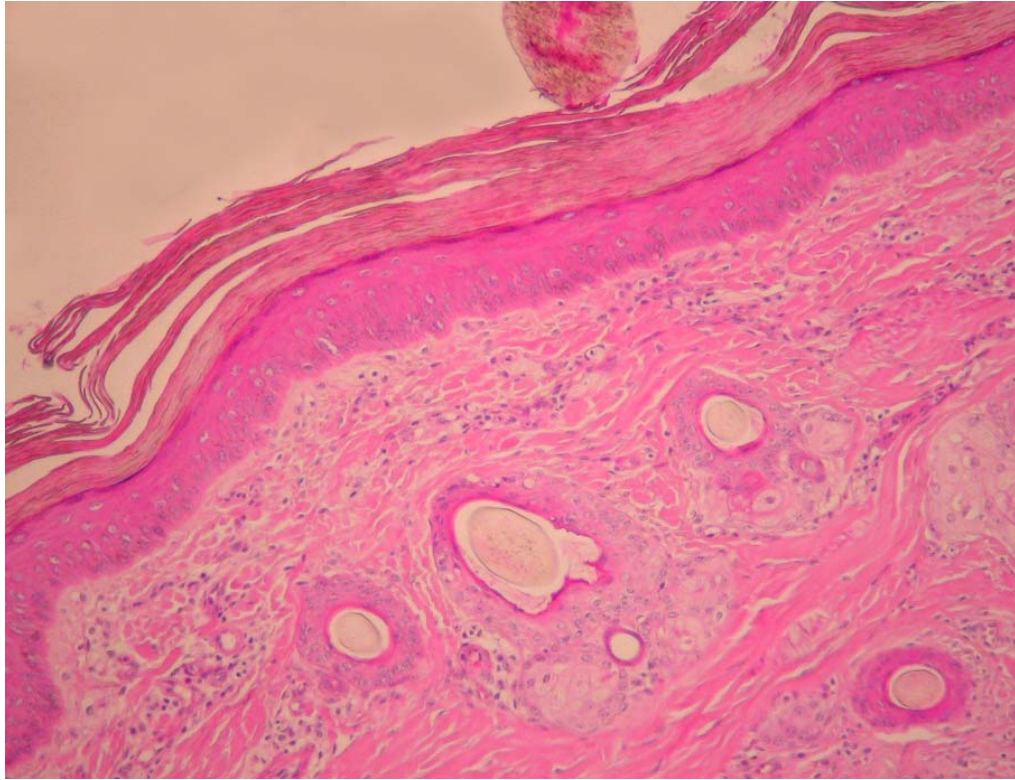


Figura 13. Pele da cauda do bovino nº 1. Observa-se hiperqueratose ortoqueratótica. (HE Obj.10x).

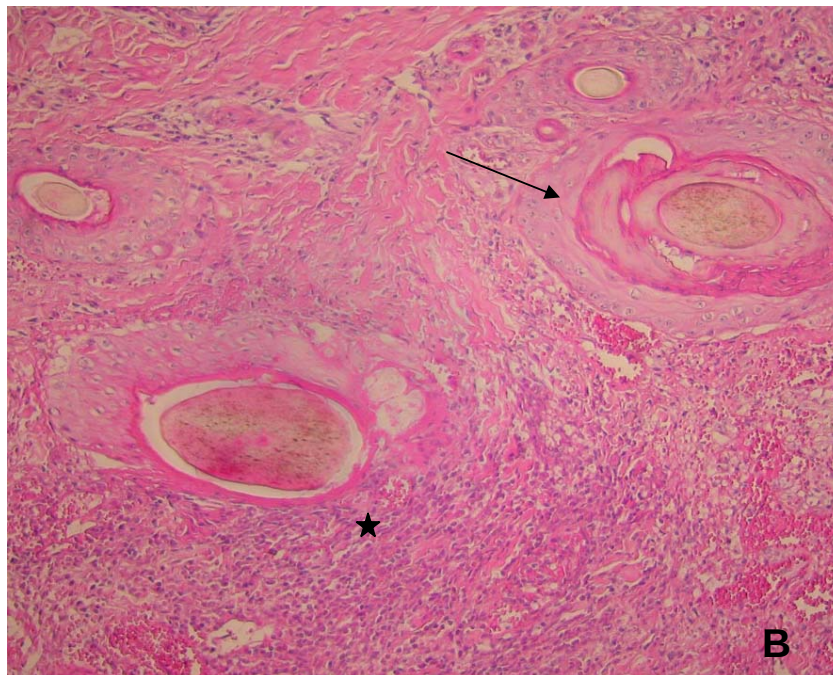
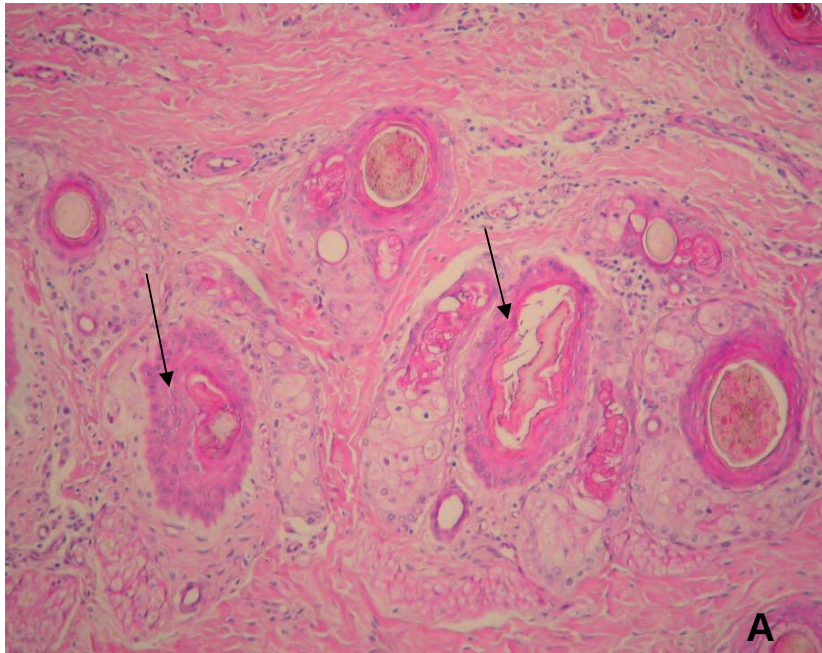


Figura 14. Pele da cauda do bovino nº 1. Alguns folículos apresentam vacuolização da bainha radicular externa (A), espessamento da queratina tricolemal (setas) (A e B) e infiltrado inflamatório mononuclear ao redor dos folículos e degeneração da parede do folicular (*) (B). (HE Obj.10x).

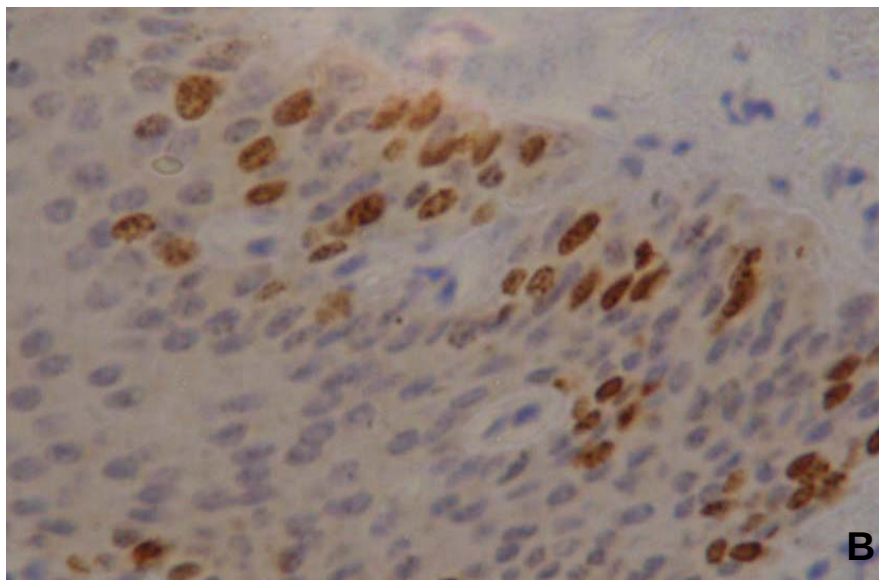
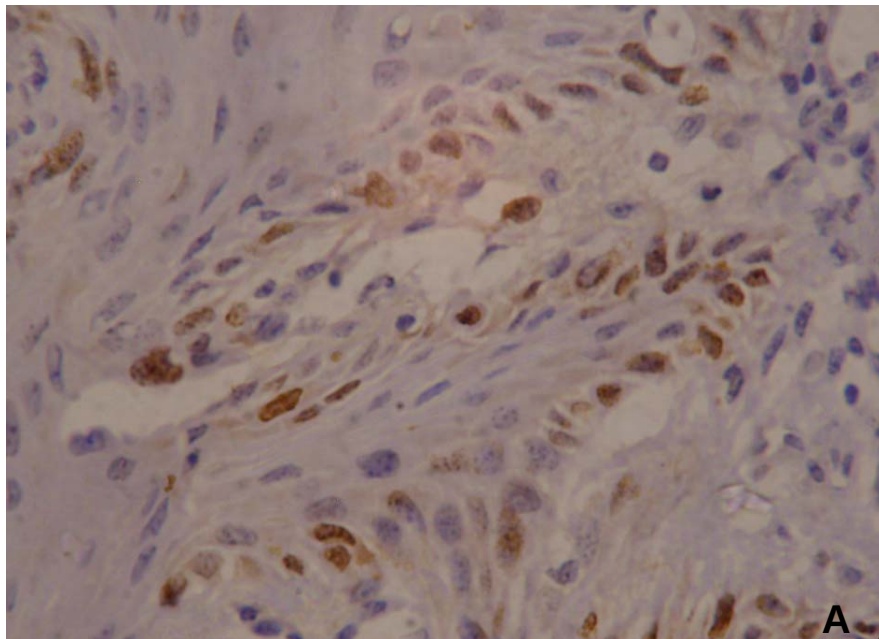


Figura 15. Imunohistoquímica para marcação de proliferação celular com o anticorpo primário monoclonal anti-Ki-67. Não se observam diferenças de marcação celular entre o bovino nº 1 intoxicado (A) e o bovino controle (B). (Obj.40x)

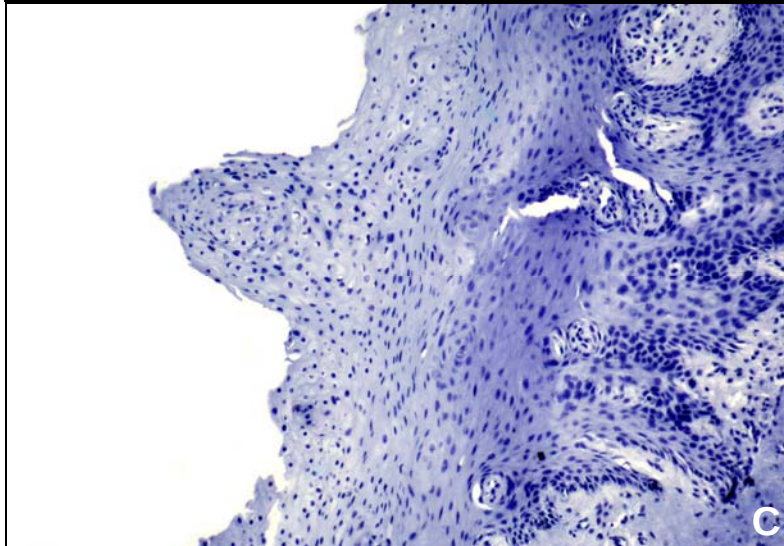
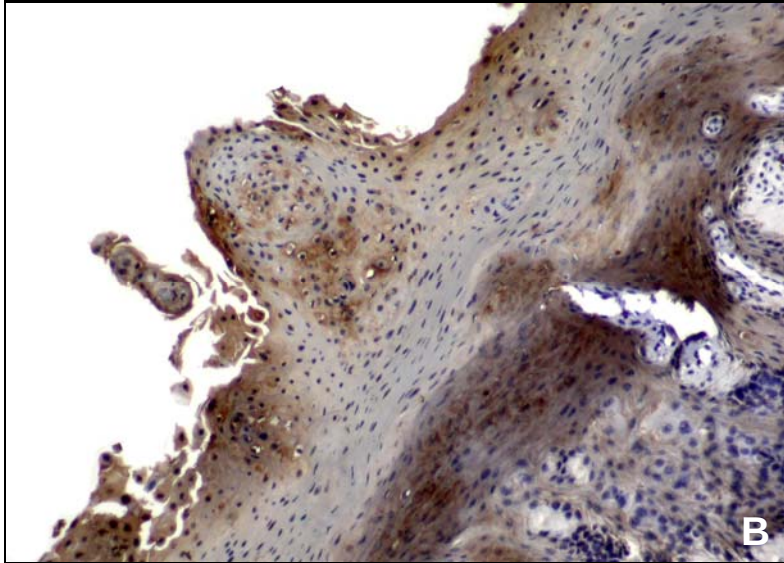
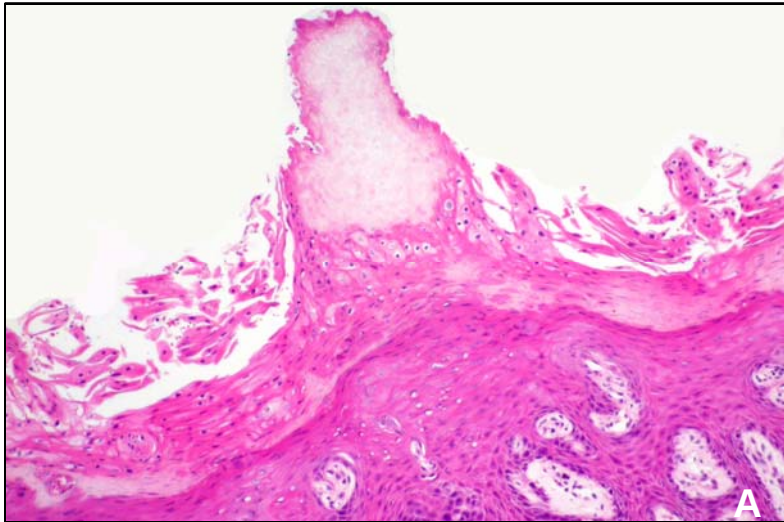


Figura 16. Imunohistoquímica utilizando anticorpo policlonal anti-pancitoqueratina bovina. A. Corte histológico de papila filiforme da língua do bovino nº 1 apresentando vacuolização dos queratinócitos e desprendimento da superfície queratinizada (HE Obj.10x). B. Observa-se um padrão irregular na distribuição da marcação para pancitoqueratina, semelhante ao que foi observado nos bovinos controle (Obj.10x). C. Controle negativo para anticorpo anti-pancitoqueratina (Obj.10x).

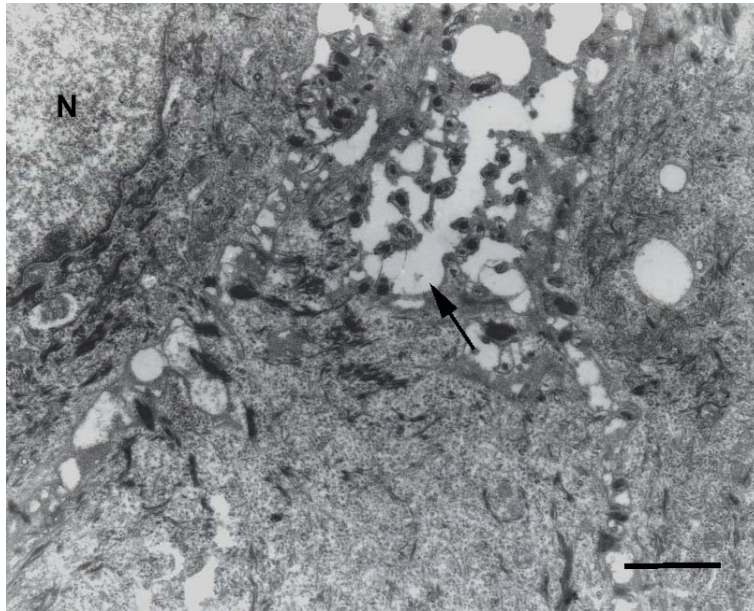


Figura 17. Bovino experimentalmente intoxicado com *Ramaria flavo-brunnescens*. Os queratinócitos da camada espinhosa do epitélio da língua mostram diminuição dos tonofilamentos e dilatação dos espaços intercelulares (seta). N= núcleo. Barra = 2 μ m.

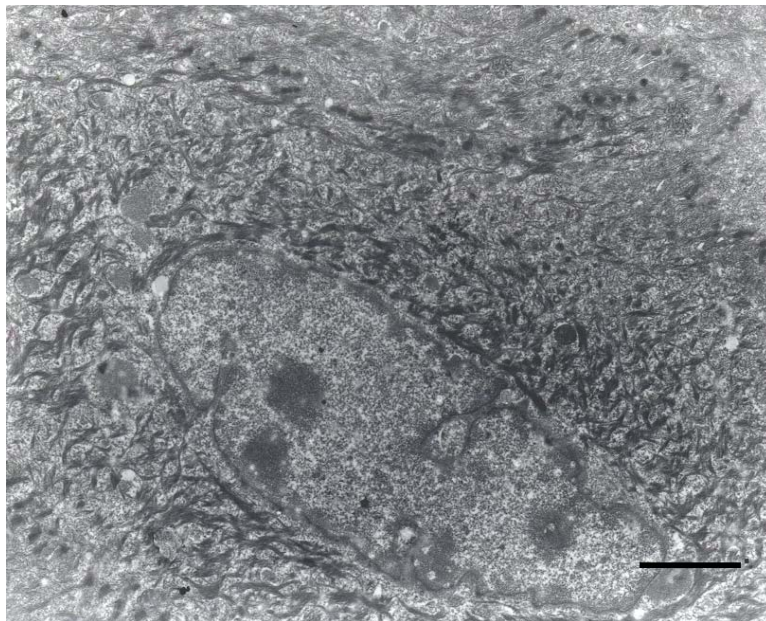


Figura 18. Bovino controle. Os queratinócitos da camada espinhosa mostram padrão de distribuição normal dos tonofilamentos. Barra = 2 μ m.