

BRENA PESSOA ROCHA

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE INTOXICAÇÕES POR PLANTAS
QUE CONTÉM SWAINSONINA EM RUMINANTES**

**RECIFE
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

BRENA PESSOA ROCHA

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE INTOXICAÇÕES POR PLANTAS
QUE CONTÉM SWAINSONINA EM RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

**RECIFE
2016**

Ficha catalográfica

R672m Rocha, Brena Pessoa
Métodos diagnósticos de intoxicações por plantas que contém
swainsonina em ruminantes / Brena Pessoa Rocha. – Recife, 2016.
44 f. : il.

Orientador: Joaquim Evêncio Neto.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.
Referências.

1. Doença de depósito lissossomal 2. Ipomoea spp.
4. Neuropatologia veterinária 5. Plantas Tóxicas 6. Ruminantes
I. Evêncio Neto ,Joaquim, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE INTOXICAÇÕES POR PLANTAS QUE CONTÉM
SWAINSONINA EM RUMINANTES**

Dissertação de mestrado elaborada por:

BRENA PESSOA ROCHA

Aprovada em 18 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Dr. Cristiano Rocha de Aguiar Filho
Secretaria de Estado do Desenvolvimento da Agropecuária e Pesca da Paraíba

Prof. Dr. Samuel Salgado Cavalcanti de Albuquerque
Instituto Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fortaleza que nunca me deixou enfraquecer e está presente em todos os momentos de minha vida.

A meus pais, Thereza Pessoa e Tomaz Rocha Junior, que são meu alicerce de força e coragem, que dedicaram a vida pela minha criação. Agradeço a vocês que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e me aconselharam nos caminhos a serem trilhados.

A meus irmãos, Thiago Pessoa e Jorge Pessoa, pelo companheirismo e apoio. Por estarem nos meus melhores e piores momentos.

Aos meus avós, José Norberto (*in memoriam*) e Djanira Braga, por serem exemplos de sabedoria e experiência. Agradeço ao meu avô, por ter sido um exemplo de pai, marido e irmão.

Ao meu orientador, Joaquim Evêncio Neto, por ter me aceitado e me dado às mãos em todas as horas que precisei e por ser um grande mestre para todos os seus orientados e colegas de trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao professor Fábio de Souza Mendonça, por todos os anos de trabalho e amizade que foram essenciais para minha formação profissional e pessoal, muito obrigada.

Ao professor David Driemeier que abriu as portas de seu laboratório para que pudesse continuar a minha pesquisa.

A Matheus Reis e Fabiana Bombaiad por terem sido tão solícitos, me ensinando e ajudando na realização da histoquímica de lectinas.

Ao professor Samuel Salgado por aceitar fazer parte de minha banca de dissertação, contribuindo positivamente para o trabalho.

A todos da histologia, em especial Edna, Mariana e Vanessa que estiveram ao meu lado no cotidiano e no meio às dificuldades encontradas no caminho.

A todos do LDA, que tiveram uma participação ímpar na minha formação como estudante e profissional. Em especial a Daniela Bueno pela sua ajuda e amizade diariamente durante esses anos do mestrado. Obrigada por todo seu carinho e dedicação.

A Valdir Almeida pela sua colaboração, ensinamentos e ajuda na elaboração do experimento.

A Josenaldo Macêdo por ser essa pessoa tão iluminada. Obrigada pela amizade, cooperação e respeito.

A Ingrid Cavalcanti e Naiara Nascimento que permaneceram ao meu lado me ajudando e trocando experiências nesses últimos sete anos dentro da Medicina Veterinária. Muito obrigada pelo apoio.

A Felipe Rabêlo por todo o amor, compreensão, paciência e suporte nesse último ano juntos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Aos animais, que são minha grande fonte de inspiração, e em especial os caprinos utilizados nesse estudo. Sem eles não teria conseguido.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e sucesso profissional.

Muito obrigada!

*“Não cruze os braços diante de uma
dificuldade, pois o maior homem do
mundo morreu de braços abertos!”*

Bob Marley

RESUMO

As plantas que contém swainsonina causam alterações neurológicas associadas com o armazenamento de oligossacarídeos para os animais de produção. Essas desordens podem ser irreversíveis e, para que isto não ocorra o diagnóstico dessas intoxicações deve ser realizado preferencialmente antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Essa dissertação consiste de um artigo que aborda o uso da técnica de biópsia hepática como um método a ser utilizado para o diagnóstico precoce em caprinos intoxicados por *Ipomoea marcellia*. Neste artigo foi realizado um experimento com oito caprinos divididos em dois grupos: Grupo I, contendo seis animais que receberam misturadas à ração as folhas dessecadas de *Ipomoea marcellia* contendo 0,02% de swainsonina na dose de 4g/kg até a observação dos primeiros sinais neurológicos; e o grupo II ou grupo controle, formado por dois animais que não recebiam a planta na dieta. Biópsias hepáticas foram realizadas no dia zero e com intervalos semanais em todos os animais, totalizando sete coletas em cada um. A técnica utilizada na biópsia hepática foi percutânea cega com agulha de Menghini e posteriormente os fragmentos foram processados rotineiramente e as lâminas coradas pela hematoxilina ou submetidas à técnica de histoquímica de lectinas. À histologia o parênquima hepático já apresentava vacúolos característicos da doença de depósito lisossomal a partir do 7º dia de consumo da planta. Os sinais clínicos, porém, só começaram a aparecer a partir do 27º dia nos caprinos 1-4 e 6. Apenas o caprino 5 apresentou a doença clínica a partir do 22º dia de consumo da planta. Esses sinais consistiram principalmente em alterações nervosas, como alterações de equilíbrio, postura e coordenação. As lâminas submetidas à técnica de histoquímica de lectinas apresentaram graus diferentes de marcação, desde leve a moderadas. As marcações mais intensas nos hepatócitos dos caprinos do Grupo I foram obtidas com as lectinas Con-A e WGA. Esses resultados demonstram que a biópsia hepática é um método eficiente para diagnosticar a doença de depósito lisossomal antes mesmo do aparecimento dos primeiros sinais clínicos em caprinos intoxicados por *I. marcellia*.

Palavras-chave: animais de produção, doença de depósito lisossomal, *Ipomoea* sp., neuropatologia veterinária, plantas tóxicas.

ABSTRACT

Swainsonine containing plants cause neurological signs in farm animals associated with oligosaccharide storage. These disorders may be irreversible and therefore the diagnosis must be early before of the first clinical signs. This dissertation consisted of an article that discusses the use of liver biopsy technique as a method to be used for early diagnosis of goats poisoned by *Ipomoea marcellia*. In the experiment eight goats were divided into two groups: Group I, consisted of six animals that receive comercial food mixed with dried leaves of *Ipomoea marcellia* containing 0.02% swainsonine at the dose of 4g / kg until the observation of the first neurological signs; and Group II (control group), consisted of two animals that did not received the plant in the diet. Liver biopsies were performed on day zero and at weekly intervals in all animals, totalizing seven collections. The technique used was a blind percutaneous liver biopsy with Menghini needle. The fragments were processed routinely and the slides were stained with hematoxylin-eosin or submitted to lectins histochemistry technique. Histologically the liver parenchyma had vacuoles characteristic of lysosomal storage disease from the 7th day of plant consumption. The clinical signs, however, only began to appear from the 27th day in goats 1-4 and 6. Only goat 5 showed clinical disease from the 22th day of plant consumption. These signals consisted mainly of neurological disorders such as balance changes, posture and coordination. The biopsies stained by lectin histochemistry technique showed different degrees of staining, from mild to moderate. Goats of Group I showed more intense staining of hepatocytes with lectins Con-A and WGA. These results demonstrate that liver biopsy is an efficient method for the diagnostic of lysosomal storage disease before the onset of clinical signs in goats poisoned by swainsonine containing plants.

Keywords: farm animals, *Ipomoea* sp., lysosomal storage disease, toxic plants, veterinary neuropathology.

LISTA DE FIGURAS

Artigo Científico

- Figura 1. Doença de depósito lisossomal (DDL) induzida pelo consumo de *I. marcellia* em caprinos. Aspecto histológico das lesões hepáticas.** **A.** Comprometimento hepático grau 0. Ausência de lesões. **B.** Comprometimento hepático grau 1. Pequena quantidade de hepatócitos com núcleo central e citoplasma contendo múltiplos vacúolos diminutos. **C.** Comprometimento hepático grau 2. Presença de hepatócitos necróticos e/ou hepatócitos contendo um único vacúolo citoplasmático e núcleos periféricos comprimidos contra as membranas plasmáticas. **D.** Comprometimento hepático grau 3. Hepatócitos necróticos e intensa e difusa vacuolização citoplasmática. Coloração: HE.....37
- Figura 2. Doença de depósito lisossomal (DDL) induzida pelo consumo de *I. marcellia* em caprinos. Aspecto histológico das lesões hepáticas marcadas com lectina.** **A.** Acentuada reatividade para a lectina Con-A em biópsia hepática com comprometimento grau 2. **B.** Controle negativo com ausência de reatividade em hepatócitos.....38

LISTA DE TABELA

Artigo Científico

Tabela 1. Grau de comprometimento dos hepatócitos de caprinos intoxicados experimentalmente por <i>I. marcellia</i>	36
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	232
2. REVISÃO DE LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
2.1 Plantas tóxicas de importância pecuária no Brasil.....	Erro! Indicador não definido.
2.1.1 Plantas que causam perturbações nervosas	Erro! Indicador não definido. 4
2.1.2 Intoxicações por plantas que contém swainsonina.....	15
2.1.3. Intoxicações por plantas que contém swainsonina no Brasil	246
2.1.3.1. Sinais Clínicos.....	Erro! Indicador não definido. 7
2.1.3.2. Achados Macroscópicos.....	Erro! Indicador não definido. 8
2.1.3.3. Achados Microscópicos	Erro! Indicador não definido. 8
2.1.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	Erro! Indicador não definido. 9
2.1.3.5. Utilização de histoquímica de lectinas	19
2.1.3.6. Abordagem Diagnóstica	44
2.1.3.7. Tratamento e Profilaxia	2Erro! Indicador não definido.
3. REFERÊNCIAS	343
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	443
5. ANEXO	44

INTRODUÇÃO

O número de plantas tóxicas para ruminantes tem aumentado continuamente. No Brasil, em 2012 já se estimavam 131 espécies e 79 gêneros conhecidos como tóxicos. Em função de o Brasil ser um país de grande extensão territorial, e na maioria dos estabelecimentos os animais serem criados em sistemas extensivos ou semiextensivo, o número de registros de surtos de intoxicações por plantas em animais de produção é crescente (PESSOA et al., 2013).

As plantas tóxicas podem ser didaticamente divididas de acordo com o quadro clínico-patológico que provocam e em função do sistema que é afetado. Dentre as plantas tóxicas que causam perturbações nervosas, compõem um importante grupo as plantas que contém swainsonina e estas estão associadas a doenças de armazenamento (TOKARNIA et al., 2012). No nordeste brasileiro as intoxicações por plantas que contém esse alcaloide ocorrem principalmente em caprinos (COLODEL et al., 2002a; DANTAS et al., 2007; MENDONÇA et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012), porém os ovinos, bovinos (GUEDES et al., 2007) e ocasionalmente equinos (DANTAS et al., 2007; ASSIS et al., 2010) podem ser acometidos. Além de desordens neurológicas esse grupo de plantas pode provocar nos animais alterações endócrinas e reprodutivas (OLIVEIRA et al., 2011).

O diagnóstico de surtos de intoxicações por plantas que contém swainsonina deve se basear no quadro clínico, associado à evidência de que os animais estão ingerindo as plantas em grande quantidade e a histopatologia. Em caprinos o “teste de se levantar” é de valor na detecção de casos com sintomatologia inaparente ou mais leve. Além disso, a lectinohistoquímica e microscopia eletrônica podem ser de grande valor para a diferenciação de intoxicações por plantas que causam lipidose e glicoproteinose (ARMIÉN, 2000; TOKARNIA et al., 2012).

Essa dissertação tem como objetivo descrever os métodos que podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico de surtos de intoxicações por plantas que contém swainsonina em ruminantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Tóxicas de importância pecuária no Brasil

As plantas tóxicas de interesse pecuário são aquelas que, quando ingeridas pelos animais de produção, sob condições naturais, causam danos à saúde ou mesmo a morte (TOKARNIA et al., 2012). Apesar de serem difíceis de estimar devido à escassez de dados, as intoxicações por plantas causam grandes perdas econômicas no rebanho brasileiro (PESSOA et al., 2013).

No Brasil, de uma população de 221.827.299 bovinos (IBGE, 2012) morrem entre 820.761 e 1.755.763 anualmente intoxicados por plantas (RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001; PEDROSO et al., 2007; RISSI et al., 2007; CASAGRANDE et al., 2008; ASSIS et al., 2010). A população de equinos no Brasil é de 5.508.546 cabeças (IBGE, 2012) e calcula-se que 38.559 equinos morrem anualmente por essa mesma causa (ASSIS et al., 2010; PESSOA et al., 2013).

O rebanho de ovinos no Brasil é de 17.662.201 cabeças (IBGE, 2012) e considerando os dados de diagnósticos de diferentes Estados (PEDROSO et al., 2007; BORELLI et al., 2008; ASSIS et al., 2010) é possível considerar que anualmente morrem de intoxicação por plantas entre 11,46% e 13,8% das mortes que ocorrem no rebanho ovino, ou seja de 399.800 a 445.309 animais (PESSOA et al., 2013). Já para caprinos estima-se que 52.675 a 63.292 animais morrem anualmente por plantas tóxicas (PEDROSO et al., 2007; ASSIS et al., 2010; PESSOA et al., 2013) de um rebanho total no país de 9.384.894 animais (IBGE, 2012).

Apesar das numerosas plantas tóxicas descritas no Brasil, as que afetam o funcionamento cardíaco estão entre as mais importantes. Entre elas estão as que causam “morte súbita”, como *Palicourea marcgravii* que foi a primeira planta tóxica brasileira estudada e pode ser encontrada em todo o país, exceto nos estados da região Sul, no semiárido do Nordeste e no Mato Grosso do Sul. Outras plantas importantes que causam morte súbita em bovinos são *Arrabidaea bilabiata* e *Arrabidaea japurensis* na região Norte (TOKARNIA et al., 1990). *Amorimia* spp. são plantas tóxicas importantes nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste (PESSOA et al., 2013). Entre as plantas que causam intoxicações de evolução subaguda a crônica está *Tetrapteryx* spp e tem ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. (TOKARNIA et al., 2012; PESSOA et al., 2013). *Baccharis coridifolia* e *Stryphnodendron coriaceum* são importantes plantas que tem ação sobre o trato digestório. Porém, enquanto a primeira tem seu habitat no Sul da Brasil, a última é bastante conhecida na região Nordeste

(BRITO et al., 1995; ALDA et al., 2009). Nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, a planta tóxica mais importante é *Cestrum laevigatum* que sob condições naturais, causa intoxicação aguda com necrose coagulativa do fígado (TOKARNIA et al., 2002). *Thiloa glaucocarpa* que é uma das plantas mais características da caatinga, e também podem ser observadas no litoral do Nordeste é nefrotóxica e causam mortandades em bovinos (TOKARNIA et al., 1981).

Para a região Nordeste *Amorimia* spp. e *Mimosa tenuiflora* são, provavelmente, as principais plantas tóxicas, porém *Ipomoea asarifolia* é a planta que causa maior número de intoxicações em ruminantes na região Nordeste e na Ilha de Marajó, mesmo causando uma baixa mortalidade. Para os equinos no Brasil, as principais plantas tóxicas são *Brachiaria humidicola* e *Crotalaria retusa* sendo que *C. retusa* causa intoxicações apenas no semiárido brasileiro. As plantas tóxicas mais importantes para caprinos são as que contêm swainsonina: *Ipomoea carnea* no Nordeste e Ilha de Marajó; *Turbina cordata* no Nordeste; e *Sida carpinifolia* no Sul e Sudeste. (PESSOA et al., 2013).

2.1.1 Plantas que causam perturbações nervosas

No Brasil, as plantas que afetam o sistema nervoso dos animais induzem enfermidades com diferentes aspectos clínico-patológicos que variam de acordo com o princípio tóxico das plantas. (TOKARNIA et al., 2012).

Um grupo importante é das plantas que provocam as doenças de depósito lisossomal (DDL) e caracterizam-se pelo acúmulo de substratos não-metabolizados nos lisossomos, resultante da atividade deficiente de hidrolases ácidas. A DDL afeta o sistema nervoso central (SNC) de animais e humanos e como consequência causam distúrbios neurológicos (RALPH, 1990).

Em animais, ocorrem dois tipos de DDL: as hereditárias, devidas a diferentes mutações genéticas, e as adquiridas, causadas pela ingestão de plantas tóxicas que contêm inibidores específicos de uma ou mais enzimas catabólicas lisossômicas (SUMMERS et al., 1995; JOLLY & WALKLEY, 1997). A ocorrência de glicogenose hereditária em bovinos Brahman constitui o único relato de DDL de origem genética em bovinos no Brasil (ZLOTOWSKI et al., 2005). Já as DDL adquiridas pela ingestão de plantas incluem α -manosidoses causadas por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (RIET-CORREA et al., 2003), *Ipomoea verbascoidea* (MENDONÇA et al., 2011), *Ipomoea sericophylla* (BARBOSA et al.,

2007), *Ipomoea riedelli* (BARBOSA et al., 2007) e *Sida carpinifolia* (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002b), lipofuscinose causada por *Phalaris angusta* (BARROS et al., 2006) e uma neurolipidose causada por *Solanum fastigiatum* e *Solanum paniculatum* (RIET-CORREA et al., 1983, BARROS et al., 1987; PAULOVICH et al., 2002).

Além da DDL, plantas pertencentes a outros grupos também provocam distúrbios neurológicos como as que causam lesões localizadas no SNC através da ingestão de *Prosopis juliflora* (TABOSA et al., 2000, 2006), síndrome tremorgênica pela ingestão de *Ipomoea asarifolia* (MEDEIROS et al., 2003) e as que contém tiaminase como *Pteridium aquilinum* (EVANS, 1976; MEYER, 1989) e *Equisetum* spp. (MEYER, 1989).

Ricinus communis que tem como nomes populares “mamona” ou “carrapateira” tem histórico tem intoxicações quando os animais ingerem as folhas ou pericarpo, cujo quadro clínico é predominantemente nervoso. Porém, apesar das sementes serem tóxicas causam sinais de irritação nas mucosas do trato digestório. Intoxicações naturais das folhas já foram descritas em ovinos e bovinos no Nordeste Brasileiro (TOKARNIA et al., 2012).

2.1.2 Intoxicações por plantas quem contém swainsonina

As plantas que contêm swainsonina e causam desordens neurológicas associadas com armazenamento de oligossacarídeos compõem um grupo muito importante de plantas tóxicas (TOKARNIA et al., 2012). Com esse mesmo princípio ativo inclui-se *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp. que têm causado intoxicação em animais de produção nos Estados Unidos (STEGELMEIER et al., 1995; PFISTER et al., 2003), *Swainsona* spp. responsável por intoxicações na Austrália (COLEGATE et al., 1979), *Ipomoea carnea* no Sudão (DAMIR et al., 1987) e Moçambique (BALOGH et al., 1999), *Ipomoea hieronymi* var. *caichaquina* na Argentina (ARRESTO et al., 2004). O Brasil é representado pela *Sida carpinifolia* (DRIEMEIER et al. 2000), *Ipomoea sericophylla*, *Ipomoea riedelli* e *Ipomoea verbascoidea* (BARBOSA et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2011) e *Turbina cordata* (DANTAS et al., 2007).

O gênero *Astragalus* sp. possui aproximadamente 300 espécies e as espécies que são tóxicas se dividem em três grandes grupos, de acordo com suas características químicas: os que contêm radicais nitrogenados, os que acumulam selênio e os do tipo “locoweed” (gêneros *Astragalus* sp. e *Oxytropis* sp.). As plantas deste último tipo possuem ações tóxicas semelhantes (CARLTON & MCGAVIN, 1998; JAMES et al., 1981; JOLLY & WALKLEY,

1997). Os principais danos causados pela intoxicação pelas “locoweeds” são: alterações neurológicas, emaciação, alteração no comportamento, problemas reprodutivos (aborto, teratogenia, interferência na espermatogênese e oogênese) (SHARMA et al., 1984).

Segundo estudos, as “locoweeds” que contém ao menos 0,001% de swainsonina podem causar danos neurológicos. A swainsonina, por possuir uma extraordinária capacidade de inibir a α -manosidase, produz quadros de intoxicação em ruminantes, sem que grandes quantidades das plantas sejam consumidas. Nesses casos, o mais importante é o consumo contínuo e prolongado da planta, para que a atividade enzimática seja suprimida e desenvolva a vacuolização celular característica da intoxicação (BALOGH et al., 1999).

2.1.3 Intoxicações por plantas quem contém swainsonina no Brasil

Na região Nordeste, *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (TOKARNIA et al., 1960; ARMIÉN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009a), *Ipomoea riedelii*, *Ipomoea sericophylla* (BARBOSA et al., 2006; 2007), *Ipomoea verbascoidea* (MENDONÇA et al., 2012) e *Turbina cordata* (DANTAS et al., 2007) são as plantas tóxicas mais importantes para caprinos e ocasionalmente afetam ovinos, bovinos e equinos. Na Ilha de Marajó, a intoxicação por *I. carnea* subsp. *fistulosa* é a doença mais importante de caprinos (OLIVEIRA et al., 2010) e, no Centro-Oeste, esta planta causa intoxicações em bovinos (ANTONIASSI et al., 2007). Nas regiões Sul e Sudeste, esse grupo é representado por *Sida carpinifolia*, que causa intoxicação em caprinos, ovinos, bovinos e equinos (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002ab; LORETTI et al., 2003).

Turbina cordata, cipó da família Convolvulaceae, tem os nomes populares de “capoteira” ou “batata-de-peba” e é responsável por surtos de intoxicação principalmente no período de brotação, quando a maior parte da vegetação ainda está seca (TOKARNIA et al., 2012).

A intoxicação por *S. carpinifolia* (guanxuma, chá da índia), planta subarborescente, da família Malvaceae, é frequente em locais úmidos e sombreados das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte do Brasil. A intoxicação foi primeiramente diagnosticada no Rio Grande do Sul em caprinos (DRIEMEIER et al., 2000). Mais tarde foi também descrita em bovinos (OLIVEIRA et al., 2009b), pôneis (LORETTI et al., 2003), ovinos (SEITZ et al., 2005) e cervos (PEDROSO et al., 2009). Apesar de ocorrer em praticamente todo país não é uma planta tóxica de grande importância pecuária, visto que raramente é consumida pelos animais a ponto de causar intoxicação (TOKARNIA et al., 2012).

I. carnea subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) é um arbusto ereto comumente conhecido como “algodão-bravo”, “mata bode”, “canudo”, e costuma ser encontrado em beiras de rios e açudes, que permanece verde durante todo o ano. (TOKARNIA et al., 2012). Geralmente, para que a intoxicação ocorra, os animais têm que ingerir grandes quantidades das partes aéreas da planta durante semanas (TOKARNIA et al., 1960).

I. sericophylla (jetirana), *I. riedelii* (anicão) e *I. verbascoidea* (jetirana, orelha-de-onça ou batata-de-peba) são cipós da família Convolvulaceae que causam intoxicação em caprinos no semiárido da Paraíba e Pernambuco. A intoxicação por *I. sericophylla* foi diagnosticada nos municípios de São Sebastião do Umbuzeiro, PB, (BARBOSA et al., 2006) e Sertânia, PE (MENDONÇA et al., 2011); a intoxicação por *I. riedelii*, no município de Zabelé, PB (BARBOSA et al., 2006); e a intoxicação por *I. verbascoidea*, no município de Sertânia, PE (MENDONÇA et al., 2012). Essas três espécies de *Ipomoea* crescem e causam intoxicação durante o período de chuvas (janeiro/ fevereiro a abril/maio) e secam no início da seca, após a frutificação, rebrotando no início das chuvas (BARBOSA et al., 2006; MENDONÇA et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012).

Uma importante característica das plantas que contêm swainsonina é a de que, independente da sua palatabilidade, animais que iniciam a ingerir essas plantas desenvolvem o hábito de ingeri-las compulsivamente (vício) e, por um mecanismo de facilitação social, induzem a outros animais da mesma espécie a ingeri-las (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; DANTAS et al., 2007; BARBOSA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009a; MENDONÇA et al., 2012). Essa característica dificulta a criação de animais em regimes extensivos ou semi-extensivos em áreas invadidas pelas plantas sem que haja surtos de intoxicações.

2.1.3.1. Sinais Clínicos

As intoxicações por plantas que contêm manosidases possuem um caráter crônico e os sinais clínicos aparecem apenas quando os animais ingerem a planta por longos períodos, ou seja, no mínimo por várias semanas (PEDROSO, 2010).

Os sinais clínicos consistem principalmente em distúrbios neurológicos, embora alterações endócrinas e reprodutivas também possam ocorrer (OLIVEIRA et al. 2011). As alterações neurológicas observadas são principalmente de origem cerebelar; evidenciadas pela perda do equilíbrio, seguida de quedas quando os animais são estressados, ataxia, hipermetria, dismetria, nistagmo, marcha lateral e tremores de cabeça e pescoço. Após sofrerem quedas, os

animais têm dificuldade em se levantar e podem apresentar espasticidade dos membros pélvicos. Outras alterações, tais como sonolência, emagrecimento progressivo, pelos arrepiados, opacos e quebradiços também podem ser observados (OLIVEIRA et al. 2009a, TOKARNIA et al. 2012, OLIVEIRA JUNIOR et al. 2013). A dificuldade de se manter em estação após a realização do head raising test, que é um exame o qual consiste em levantar a cabeça do animal, segurá-la por um minuto e depois soltá-la é um indício de alteração nervosa.

Se os animais deixam de ingerir essas plantas no início dos sinais nervosos ou mesmo 15-30 dias após, os sinais são reversíveis. No entanto, em animais que continuam a ingeri-las, os sinais nervosos se tornam irreversíveis, em consequência da perda neuronal (RIET-CORREA et al., 2009). Oliveira et al. (2011) observaram que em caprinos intoxicados por *I. fistulosa* que apresentavam sinais clínicos discretos houve uma diminuição da sintomatologia, porém, aqueles que já demonstravam sinais clínicos de moderados a severos a regressão dos sinais clínicos não foi observado.

Além das desordens neurológicas, foram observadas alterações reprodutivas caracterizadas por infertilidade, abortos e nascimento de animais fracos podem ocorrer durante o consumo de *S. carpinifolia* (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; SEITZ et al., 2005), *I. carnea* subsp. *fistulosa* (SCHWARZ et al., 2003; HUEZA et al., 2007) e, possivelmente, *I. riedelii*, *I. sericophylla* e *T. cordata* (RIET-CORREA et al., 2009).

2.1.3.2. Achados Macroscópicos

Na maioria dos casos de animais intoxicados por essas plantas não são encontradas alterações significativas na necropsia. Porém, Seitz et al. (2005) descreveram aumento de volume dos linfonodos mesentéricos em ovinos intoxicados por *Sida carpinifolia*.

2.1.3.3. Achados Microscópicos

As principais alterações histológicas nos animais intoxicados por plantas que contêm swainsonina são encontradas no SNC e caracterizam-se por distensão e vacuolização no pericário de neurônios, principalmente das células de Purkinje do cerebelo, mas também são afetados neurônios de outras regiões, incluindo córtex cerebral, tálamo, mesencéfalo e medula espinhal. Alguns neurônios do cerebelo e dos núcleos cerebelares apresentam núcleos picnóticos e marginalizados e citoplasma espumoso e pálido, sem bordas definidas.

Degeneração Walleriana, caracterizada pela presença de numerosos esferoides axonais, observa-se principalmente na camada granular e substância branca cerebelar. Nos casos crônicos, há desaparecimento de neurônios, melhor evidenciado no cerebelo em que desaparecem os neurônios de Purkinje, que são substituídos por proliferação da glia de Bergmann (OLIVEIRA et al., 2009a; MENDONÇA et al., 2011; BARBOSA et al., 2006). Vacuolização citoplasmática pode, também, ser encontrada em células epiteliais do pâncreas e dos túbulos renais, em células foliculares na tireoide e em hepatócitos e em macrófagos de órgãos linfoides (DRIEMEIER et al., 2000; BARBOSA et al., 2007; DANTAS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009a; MENDONÇA et al., 2011).

2.1.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Na microscopia eletrônica de transmissão, os vacúolos observados na microscopia ótica representam lisossomos dilatados, rodeados por uma única membrana, que estão vazios ou contêm fragmentos amorfos membranosos ou material finamente granulado eletrolúcido (DRIEMEIER et al., 2000; COLODEL et al., 2002a; BARBOSA et al., 2006; ARMIÉN et al., 2007; PEDROSO et al., 2012).

2.1.3.5. Utilização da histoquímica de lectinas

As lectinas são proteínas e glicoproteínas que se ligam seletivamente com resíduos de carboidratos não covalente. É por isso que elas são de interesse e uso em histoquímica, pois elas podem ser específicas para localizar monossacarídeos e oligossacarídeos (BROOKS et al., 2007).

Enquanto as microscopias de luz e eletrônica são utilizadas para observar a presença de armazenamento lisossomal, a histoquímica de lectinas permite a detecção de açúcares específicos, fornecendo assim dados adicionais ao diagnóstico (ALROY et al., 1984; GLEW et al., 1985).

A partir da reatividade com a respectiva lectina prevê-se qual o oligossacarídeo que está se acumulando nas células. As principais lectinas utilizadas em doenças do depósito lisossomal são a *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Glycine max* (SBA), *Dolichos biflorus* (DBA), *Ulex europaeus-1* (UEA-1), *Triticum vulgaris* (WGA), *Succinyl-WGA* (sWGA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Pisum sativum* (PSA), *Ricinus communis-1* (RCA-1), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) e *Lens culinares* (LCA). Na intoxicação por *Sida carpinifolia* em

caprinos, ovinos e cervídeos, tem-se identificado marcação com as lectinas Con-A, WGA e sWGA (DRIEMEIER et al., 2000; PEDROSO et al., 2009, 2012).

Em caprinos intoxicados natural e experimentalmente por *I. carnea* subsp. *fi stulosa*, as principais lectinas identificadas foram Con-A e WGA (ARMIÉN et al., 2007). Na intoxicação natural por *I. sericophylla* e *I. riedelii*, observou-se forte marcação nas células de Purkinje do cerebelo com as lectinas Con-A, WGA, sWGA e LCA (BARBOSA et al., 2006; MENDONÇA et al., 2011). Em caprinos intoxicados por *I. verbascoidea*, a análise histoquímica das amostras de cerebelo e pâncreas demonstrou reação positiva para WGA, sWGA, LCA, Con-A, PSA, RCA120, PNA e PHA-E, sugerindo um armazenamento de alfa-fucose, alfa-D-mannose, alfa-D-glucose, β -D-N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, e ácido acetil-neuraminico (MENDONÇA et al., 2012).

2.1.3.6. Abordagem diagnóstica

Para o diagnóstico das doenças do Sistema Nervoso, como ocorre em qualquer sistema é necessário um histórico epidemiológico e quadro clínico e, quando for o caso, uma completa descrição dos achados macroscópicos. Além disso, para facilitar o diagnóstico da intoxicação por plantas que contém swainsonina é necessária a presença da planta e lesões histológicas que caracterizem a intoxicação (RISSI et al., 2010; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013).

Um método útil ou instrumento de diagnóstico precoce para avaliar a exposição ou intoxicação por plantas contendo swainsonina é a detecção de oligossacarídeos urinários pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD) descrito por Bedin et al. (2009). Neste experimento uma excreção anormal de oligossacarídeos na urina foi observada por CCD após o segundo dia de ingestão de *Sida carpinifolia* na dieta de caprinos. Essa alteração persistiu até um dia após a retirada da planta. A rápida alteração bioquímica na urina é bastante importante para identificar e corrigir o problema precocemente, até mesmo antes que o quadro seja irreversível com a destruição de neurônios, como ocorre no caso de um consumo de longa duração (RIET-CORREA & MENDEZ, 2007). Além disso, tem-se o potencial de risco dos animais se tornarem viciados em comer a planta (TOKARNIA et al., 2002).

A análise da enzima α -manosidase no plasma é outra forma de contribuir para o diagnóstico precoce de animais que estejam consumindo plantas que contém swainsonina como verificou Bedin et al. (2010). A α -manosidase foi analisada no plasma de caprinos submetidos à dieta com *Sida carpinifolia* e observou-se que houve um decréscimo

significativo quatro dias após a exposição à planta, retornando aos níveis normais 10 dias após a retirada da planta.

A determinação do conteúdo de swainsonina nas plantas presentes nos campos onde ocorre a doença pode ser importante na confirmação do diagnóstico, principalmente quando se trata de espécies não descritas anteriormente como tóxicas, ou quando há mais de uma espécie suspeita de estar causando a intoxicação (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013) e esse teor de swainsonina é medido por cromatografia líquida -espectrometria de massa (MENDONÇA et al., 2012).

2.1.3.7. Tratamento e Profilaxia

Não se conhece um tratamento específico para os casos de intoxicações por plantas que contém swainsonina e, portanto, o controle para que os animais não consumam essas plantas é a melhor maneira de se evitar as perdas econômicas. Se os animais forem retirados da área invadida após os primeiros sinais da intoxicação, eles se recuperam. Para isso, é necessário retirar os animais das áreas onde existe infestações das plantas, porém esta não é uma alternativa de fácil execução nas regiões onde essas plantas existam em grandes quantidades (BARBOSA et al., 2006; TOKARNIA et al., 2012). Experimentos realizados no Vale do Rio São Francisco indicam que talvez a *I. fistulosa* possa ser controlada pela aplicação de herbicidas (SCHMIDT & LINS, 1956).

Outra medida que vem sendo utilizada em estudos para o controle das intoxicações por plantas que contém swainsonina é a aversão alimentar condicionada, a qual consiste na administração de cloreto de lítio (Li/Cl) através de sonda ruminal, imediatamente após a ingestão da planta que se quer evitar o consumo. Recentemente, a aversão foi realizada em caprinos como forma de controle da intoxicação por *I. carnea* subsp. *fistulosa*, e foi demonstrado que esses animais recém adaptados à ingestão da planta, submetidos ao tratamento aversivo mediante a administração de LiCl (200 mg/kg), logo após a ingestão voluntária da planta, não a ingeriram por pelo menos dois anos e oito meses (OLIVEIRA et al., 2010, 2013). No entanto, se os animais avertidos convivem com animais não avertidos que ingerem a planta, a aversão desaparece rapidamente (PIMENTEL et al., 2012) e caprinos provenientes de propriedades em que existe a planta, com sinais clínicos da intoxicação, e que têm o hábito de ingerir a planta por longos períodos, não respondem ao tratamento aversivo (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013).

Em um estudo realizado com a finalidade de controlar a intoxicação por *Turbina cordata* em caprinos, em propriedades onde estava ocorrendo a doença, foi demonstrado que a técnica de aversão alimentar, administrando LiCl (175mg/kg), a cada dois meses, aos animais que ingerem a planta espontaneamente, é eficiente e viável para o controle dessa intoxicação (PIMENTEL et al., 2012). No entanto, para o controle da intoxicação por *I. carnea* subsp. *fistulosa*, a técnica impediu a ingestão da planta somente durante a época de chuva, mas não durante a seca, quando há pouca disponibilidade de forragem (PIMENTEL et al., 2012). *T. cordata*, diferentemente de *I. carnea* subsp. *fistulosa*, é uma planta que desaparece durante a época seca e rebrota após as primeiras chuvas, de forma que, se os animais têm outras forragens à disposição quando a planta está presente, é mais fácil manter a aversão (PESSOA et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS

ALDA, J. L.; SALLIS, E. S. V.; NOGUEIRA, C. E. W.; SOARES, M. P.; AMARAL, L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; FREY JR, F.; SCHILD, A. L. Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.5, p.409 – 414, 2009.

ALROY, J.; ORGAD, U.; UCCI, A. A.; PEREIRA, M. E. A. Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.32, p.311–315, 1984.

ANTONIASSI, N. A. B.; FERREIRA, E. V.; SANTOS, C. E. P.; CAMPOS, J. L. E.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Intoxicação espontânea por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em bovinos no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, n.10, p.415-418, 2007.

ARMESTRO, R. R.; REPETTO, A. E.; ORTEGA, H. H.; PERALTA, C. J.; PENSIERO, J. F.; REI, P. K.; SALVERTI, N. R. Intoxicacion em cabras por ingestion de *Ipomoea hieronymi* var. *caichaquina* en la província de Catamarca, Argentina. **Veterinaria Argentina**. v.21, p.232 – 241, 2004.

ARMIÓN, A. G. Vergleichende klinische und morphologische Untersuchungen zur spontanen und experimentellen Vergiftung durch *Ipomoea fistulosa* (Convolvulaceae) bei Ziegen. **Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades**, Giessen. 2000.

ARMIÓN, A. G.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; FRESE, K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae). **Veterinary Pathology**. v.44, p.170-184, 2007.

ASSIS, T. S.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G. J. N.; DANTAS, A. F. M.; OLIVEIRA, D. M. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.1, p.13-20, 2010.

BALOGH, K. I. M.; DIMANDE, A. P.; VAN DER LUGT, J. J.; MOLYNEUX, R. J.; NAUDÉ, T. W.; WELMAN, W. G. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.11, p. 266 – 272, 1999.

BARBOSA, R. C.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; LIMA, E. F.; BARROS, S. S.; GIMENO, E. J.; MOLYNEUX, R. J.; GARDNER, D. R. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon**. v.47, p. 371 – 379, 2006.

BARBOSA, R. C.; RIET-CORREA, F.; LIMA, E. F.; MEDEIROS, R. M. T.; GUEDES, K. M. R.; GARDNER, D. R.; MOLYNEUX, R. J.; MELO, L. E. H. Experimental swainsonine poisoning in goats ingesting *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* (Convolvulaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, n.10, p.409-414, 2007.

BARROS, S. S.; RIET-CORREIA, F.; ANDUJAR, M. B.; BARROS, C. S. L.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. *Solanum fastigiatum* and *Solanum* sp poisoning in cattle: ultrastructural changes in the cerebellum. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.7, p.1-5, 1987.

BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS, R. A. A. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**: Coleção Vallée. AGNS, São Paulo. 207p. 2006.

BEDIN, M.; COLODEL, E. M.; GIUGLIANI, R.; ZLOTWSKI, P.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Urinary oligosaccharides: A peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning. **Toxicon**. v.53, p.591-594, 2009.

BEDIN, M.; COLODEL, E. M.; VIAPIANA, M.; MATTE, U.; DRIEMEIER, D.; GIUGLIANI, R. Alpha-mannosidase activity in goats fed with *Sida carpinifolia*. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v.62, p.191-195, 2010.

BORELLI, V.; ZANDONAI, A.; FURLAN, F.; TRAVERSO, S. D.; GAVA, A. Intoxicação por plantas diagnosticadas em bovinos pelo Laboratório de Patologia Animal/CAV/UDESC. In: ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 3, 2008, Campo

Grande, MS, **Anais...**Mato Grosso do Sul: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul , 2008.

BRITO, M. F.; ARMIÉN, A. G.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.15, n.4, p.111 – 116, 1995.

BROOKS, S. A.; LEATHEM, A. J. C.; SCHUMACHER, U. **Lectin Histochemistry**. 5th Ed. Bio Scientific Publishers: Oxford. 2007.

CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. Ed. Porto Alegre: ArtMed, 672p. 1998.

CASAGRANDE, R. A.; MAZZOCCO, M. B.; FRIZON, R.; LENTZ, D.; TRAVERSO, S. D.; GAVA, A. Doenças de bovinos diagnosticadas pelo Laboratório de Patologia Animal CAV/UEDESC de janeiro de 2000 a abril de 2008. In: ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 3, 2008, Campo Grande, MS, **Anais...**Mato Grosso do Sul: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul , 2008.

COLEGATE, S. M.; DORLING, P. R.; HUXTABLE, C.R. A spectroscopic investigation of swainsonina: an alpha-mannosidase inhibitor isolated from *Swainsonia canescens*. **Australian Journal of Chemical**. v.32, p.2257-2264, 1979.

COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; LORETTI, A. P.; GIMENO, E. J.; TRAVERSO, S. D.; SEITZ, A. L.; ZLOTOWSKI, P. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.22, n.2, p.51-57, 2002a.

COLODEL, E. M.; GARDNER, D. R.; ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D. Identification of swainsonina as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. **Veterinary & Human Toxicology**. v.44, n.3, p.177-178, 2002b.

DAMIR, H. A.; ADAM, S.; TARTOUR, G. The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. **Veterinary & Human Toxicology**. v.29, p.316 – 319, 1987.

DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; GARDNER, D. R.; MEDEIROS, R. M. T.; BARROS, S. S.; ANJOS, B. L.; LUCENA, R. B. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in north-eastern Brazil. **Toxicon**. v.49, n.1, p.11-16, 2007.

DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; GIMENO, E. J.; BARROS, S. S. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. **Veterinary Pathology**. v.37, p.153-159, 2000.

EVANS, W. C. Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.73, p.113-131, 1976.

GLEW, R. H.; BASU, A.; PRENCE, E. M.; REMALEY, A. T. Lysosomal storage diseases. **Laboratory Investigation**. v.53, p.250–269, 1985.

GUEDES, K. M. R.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D.; MIRANDA NETO, E. G.; NOBRE, V. M. T.; MEDEIROS, R. M. T. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, n.1, p.29-38, 2007.

HUEZA, I. M.; GUERRA, J. L.; HARAGUCHI, M.; GARDNER, D. R.; ASANO, N.; IKEDA, K.; GÓRNIK, S. L. Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of *Ipomoea carnea* in rats. **Experimental and Toxicology Pathology**. v.58, n.6, p.439-446, 2007.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal (PPM)**. Vol.39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro-RJ. 63p. 2012.

JAMES, L. F.; HARTLEY, W. J.; VAN-KAMPEN, K. R. Syndromes of astragalus poisoning in livestock. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.178, n.2, p.146-150, 1981.

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

LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M.; GIMENO, E. J.; DRIEMEIER, D. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.434-438, 2003.

MEDEIROS, R. M. T.; BABOSA, R. C.; RIET-CORREA, F.; LIMA, E. F.; TABOSA, I. M.; BARROS, S. S.; GADNER, D. R.; MOLYNEUX, R. J. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in northeastern Brasil. **Toxicon**. v. 41, p.993 -935, 2003.

MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J.; ESTEVÃO, L. R. M.; ALBUQUERQUE, R. F.; COLODEL, E. M. Spontaneous poisoning by *Ipomoea sericophylla* (Convolvulaceae) in goats at semi-arid region of Pernambuco, Brazil: a case report. **Acta Veterinaria Brno**. v.80, n.2, p.235-239, 2011.

MENDONÇA, F. S.; ALBUQUERQUE, R. F.; EVÊNCIO-NETO, J.; FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; BOABAID, F. M.; DRIEMEIER, D.; GARDNER, D. R.; RIET-CORREA, F.; COLODEL, E. M. Alpha-mannosidosis in goats caused by the swainsonine-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 24, n.1, p.90-95, 2012.

MEYER, P. Thiaminase activities and thiamine content of *Pteridium aquilinum*, *Equisetum ramosissimum*, *Malva parviflora*, *Pennisetum clandestinum* and *Medicago sativa*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v.56, p.145-146, 1989.

OLIVEIRA, C. A.; BARBOSA, J. D.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; RIET-CORREA, F.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, G. Intoxicação por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em caprinos na Ilha do Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.7, p.583-588, 2009a.

OLIVEIRA, L. G. S. et al. Intoxicação por *Sida carpinifolia* em bovinos no Rio Grande do Sul. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2009, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: Associação Brasileira de Patologia Veterinária, 2009b.

OLIVEIRA, C. A.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; RIET-CORREA, B.; RIET-CORREA, F.; VINHOTE, W. M.; RIET-CORREA, G. Utilização da técnica de aversão alimentar condicionada em caprinos intoxicados naturalmente por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*. In: ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 6, 2010, Campo Grande, MS, **Anais...**Mato Grosso do Sul: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010.

OLIVEIRA, C. A.; RIET-CORREA, F.; DUTRA, M. D.; CERQUEIRA, D. V.; ARAÚJO, C. V.; RIET-CORREA, G. Sinais clínicos, lesões e alterações produtivas e reprodutivas em caprinos intoxicados por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) que deixaram de ingerir a planta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.11, p.953-960, 2011.

OLIVEIRA JUNIOR, C. A.; RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por plantas que contêm swainsonina no Brasil. **Ciência Rural**. v.43, n.4, p.653-661, 2013.

PAULOVICH, F. B.; PORTIANSKY, E. L.; GIMENO, E. J.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**. v.49, p.473-477, 2002.

PEDROSO, P. M. O.; PESCADOR, C. A. P.; OLIVEIRA, E. C.; SONNE, L.; BANDARRA, P. M.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. **Acta Scientiae Veterinarie**. v.35, p.213-218, 2007.

PEDROSO, P. M. O.; VON HOHENDORF, R.; OLIVEIRA, L. G. S.; SCHMITZ, M. CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D.. *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in fallow deer (*Dama dama*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.40, p.583-585, 2009.

PEDROSO, P.M.O. Doença do armazenamento lisossomal indzida pelo consumo de *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em herbívoros no Rio Grande do Sul. **Tese de doutorado**. UFRGS, 2010.

PEDROSO, P.M.O. et al. Pathological findings in fetuses of goats and cattle poisoned by *Sida carpinifolia*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.3, p.227-230, 2012.

PESSOA, C. R. M.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.6, p.752-758, 2013.

PFISTER, J. A.; STEGELMEIER, B. L.; GARDNER, D. R.; JAMES, L. F. Grazing of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) by cattle and horses in Arizona. **Journal of Animal Science**. v.81, p.2285-2293, 2003.

PIMENTEL, L. A.; MAIA, L. A.; CAMPOS, E. M.; DANTAS, A. F. M.; MEDEIROS, R. M. T.; PFISTER, J. A.; COOK, D.; RIET-CORREA, F. Aversão alimentar condicionada no controle de surtos de intoxicações por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* e *Turbina cordata*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.8, p.707-714, 2012.

RALPH, W. S. Sistema Nervoso Central, p.579-643. In: THOMSON, R.G. (Ed.), **Patologia Veterinária Especial**. Manole, São Paulo, 1990.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L.; SUMMERS, B. A.; OLIVEIRA, J. A. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration of cattle. **Cornell Veterinarian**. v.73, p.240-256, 1983.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.21, p.38-42, 2001.

RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; AZEVEDO, E. O.; MEDEIROS, R. M. T.; SIMÕES, S. V. D.; DANTAS, A. F. M.; ALVES, C. J.; NOBRE, V. M. T.; ATHAYDE, A. C. R.; GOMES, A. A.; LIMA, E. F. Doenças dos ruminantes e equinos no semi-árido da Paraíba. **Semi-árido em Foco**, Patos-UCG, v.1, n.1, p.58-60, 2003.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C. **Intoxicações por plantas e micotoxinas**. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A. L., LEMOS, R. A. A., BORGES, J. R. J. (Eds.). **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. Pallotti, Santa Maria, 3ª ed. v.2, p.99-221, 2007.

RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; MEDEIROS, R. M.; DANTAS, A. F. M. **Poisonings by Plants, Mycotoxins and Related Substances in Brazilian Livestock**. Pallotti, Santa Maria. 246p. 2009.

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A. L.; TROST, M. E.; BRUN, J. S.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, p.261-268, 2007.

RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J. C., LUCENA, R. B.; CARMO, P. M. S.; BARROS, C. S. L. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.11, p.958-967, 2010.

SCHMIDT, H.; LINS, R. G. **O canudo nas margens do Rio São Francisco. Preliminares sobre o seu controle com herbicidas**. Posto de Colonização de Petrolina, Pernambuco. 4p. 1956.

SCHWARZ, A.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M.; DAGLI, M. L.; SPINOSA, H. S. Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v.25, n.5, p.615-626, 2003.

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

SHARMA, R. P.; JAMES, L. F.; MOLYNEUX, R. J. Effect of repeated locoweed feeding on peripheral lymphocytic function and plasma proteins in sheep. **American Journal Veterinary Research**. v.45, n.10, p.2090-2093, 1984.

STEGELMEIER, B. L.; JAMES, L. F.; PANTER, K. E.; MOLYNEUX, R. J. Tissue and serum swainsonine concentrations in sheep ingesting *Astragalus letiginosus* (locoweed). **Veterinary and Human Toxicology**. v.3, n.4, p.336-339, 1995.

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

TABOSA, I. M.; SOUZA, J. C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N.; GRAÇA, D. L.; RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigeminal nuclei in goats caused by the ingestion of *Prosopis juliflora* pods (mesquite beans). **Veterinary and Human Toxicology**. v.42, p.155-158, 2000.

TABOSA, I. M.; RIET-CORREA, F.; BARROS, S. S.; SUMMERS, B. A.; SIMÕES, S. V. D.; MEDEIROS, R. M. T.; NOBRE, V. M. T. Neurohistologic and Ultrastructural Lesions in Cattle Experimentally Intoxicated with the Plant *Prosopis juliflora*. **Veterinary Pathology**, v.43, p.695-701, 2006.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Estudo experimental sobre a toxidez do “canudo” (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**. v.3, p.59-71, 1960.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C.; COUCEIRO, J. E. M.; SILVA, A. C. C.; ARAÚJO, F. V. Intoxicação de bovinos por *Thiloa glaucocarpa* (Combretaceae), no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.1, n.4, p. 111-132, 1981.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.10, n.1/2, p.1-10, 1990.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**. v.40, p.1635-1660, 2002.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro. 223p. 2012.

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

ZLOTOWSKI, P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BARROS, S. S.; GIMENO, E. J.; GÖCKS, M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D. Glicogenose hereditária em bovinos Brahman no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, p.210-214, 2005.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo aceito para publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira: Biópsia hepática como método diagnóstico para intoxicação por plantas que contém swainsonina.

Biópsia hepática como método diagnóstico para intoxicação por plantas que contém swainsonina¹

Brena P. Rocha², Matheus O. Reis³, David Driemeier³, Daniel Cook⁴, Franklin Riet-Correa⁵, Joaquim Evêncio-Neto⁶ & Fábio S. Mendonça^{6*}

ABSTRACT. – Rocha B.P., Reis O.M., Driemeier D., Cook D., Riet-Correa F., Evêncio-Neto J & Mendonça F.S. 2015. **[Liver biopsy as diagnostic method for swainsonina-containing plants poisoning.]** Biópsia hepática como método diagnóstico para intoxicação por plantas que contém swainsonina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: fabio.mendonca@pq.cnpq.br

With the aim to investigate the use of hepatic biopsies for the diagnosis of poisoning by swainsonine-containing plants, dry leaves of *Ipomoea marcellia* containing 0.02% of swainsonine were administered to goats. Group I, with six goats, ingested 4g/kg of dry plant (0.8mg of swainsonine/kg) daily until the observation of the first neurologic signs. Two goats that did not receive the plant were used as control (Group II). Hepatic biopsies with the Menghini needle were performed by the percutaneous technique at day zero and at weekly intervals after the start of the administration of *I. marcellia*. Biopsy samples were fixed in 10% formaline, processed routinely, and stained by hematoxylin-eosin and by lectins histochemistry. Hepatic lesions of lysosomal storage disease were observed from the seven day of plant consumption in the samples stained with hematoxylin-eosin. Using lectin histochemistry, better labelling was observed with *Concanavalina ensiformis* (Con-A) e *Triticum vulgaris* (WGA). It is concluded that the histology of hepatic biopsies associated with lectin histochemistry is a sensitive method to detect histologic lesions of poisoning by swainsonine-containing plants in goats without clinical signs of disease.

INDEX TERMS: Poisonous plants, lysosomal storage disease, plant poisoning.

RESUMO.- Neste trabalho objetivou-se avaliar a técnica de biópsia hepática como um teste de valor diagnóstico para intoxicações por plantas que contém swainsonina. Para isso, reproduziu-se experimentalmente a doença com as folhas secas de *Ipomoea marcellia* contendo 0,02% de swainsonina em caprinos. O Grupo I foi constituído por 6 caprinos que receberam a planta misturada a ração na dose de 4g/kg (0,8mg de swainsonina/kg) até a observação dos primeiros sinais clínicos neurológicos. Outros dois caprinos que não receberam a planta na dieta constituíram o grupo controle (Grupo II). Foram realizadas biópsias hepáticas pela técnica percutânea cega com agulha de Menghini, no dia zero e com intervalos semanais nos caprinos do experimento. As biópsias hepáticas foram fixadas em formol tamponado 10%, processadas rotineiramente, coradas pela hematoxilina-eosina e histoquímica de lectinas. Lesões hepáticas características de doença de depósito lisossomal foram identificadas em todos os caprinos do Grupo I no 7º dia de experimento nas amostras coradas pela hematoxilina-eosina. Em relação à histoquímica de lectinas, melhores marcações foram obtidas com as lectinas *Concanavalina ensiformis* (Con-A) e *Triticum vulgaris* (WGA). Concluiu-se que a técnica de biópsia hepática associada à histoquímica de lectinas é um método sensível para detectar lesões características de intoxicações por plantas que contém swainsonina em caprinos que não apresentam sinais clínicos da doença.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, doença de depósito lisossomal, ruminantes.

¹Recebido em xx de fevereiro de 2016

Aceito para publicação em xx de xx de 2016

²Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

³Setor de Patologia Veterinária (SPV), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

⁴Poisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States. Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA.

⁵Estación Experimental La Estanzuela, INIA, Ruta 50, Km 11, Colonia, Uruguay.

⁶Laboratório de Diagnóstico Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE 52171-900, Brasil.

INTRODUÇÃO

No Brasil, as plantas que contêm swainsonina compõem um grupo muito importante de plantas tóxicas devido aos sérios prejuízos econômicos que provoca à pecuária (Oliveira et al. 2013). Nas regiões Sul e Sudeste, esse grupo é representado por *Sida carpinifolia*, que causa intoxicação em caprinos, ovinos, bovinos e equinos (Driemeier et al. 2000, Colodel et al. 2002ab, Loretto et al. 2003). Na Ilha de Marajó, a intoxicação por *I. carnea* subsp. *fistulosa* é a intoxicação mais importante para caprinos (Oliveira et al. 2010) e, no Centro-Oeste, essa planta muito difundida no Pantanal, causa intoxicações em bovinos (Antoniassi et al. 2007). Porém, é na região semiárida nordestina que se concentram a maioria dos surtos espontâneos de intoxicação. Nessa região, *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Oliveira et al. 2009), *Ipomoea riedelii*, *Ipomoea sericophylla* (Barbosa et al. 2006, 2007), *Ipomoea marcellia* (= *Ipomoea* aff. *verbascoidea*) (Mendonça et al. 2012) e *Turbina cordata* (Dantas et al. 2007) são plantas tóxicas importantes para caprinos e ocasionalmente, ovinos, bovinos e equinos (Oliveira et al. 2013).

Nas condições de campo, o diagnóstico da intoxicação por plantas que contêm swainsonina é realizado pela presença das plantas nas pastagens associado à presença de animais que apresentam quadro de disfunção cerebelar. A doença deve ser confirmada por meio de lesões histológicas, que consistem principalmente em vacuolizações citoplasmáticas, ocasionadas pelo acúmulo de oligossacarídeos não processados em neurônios e células epiteliais (Lima et al. 2013, Oliveira et al. 2013). Utilizando-se histoquímica de lectinas, é possível ainda determinar quais oligossacarídeos foram acumulados e realizar a correlação entre a presença, quantidade, gravidade e a extensão das lesões nos tecidos afetados (Mendonça et al. 2012).

Quando é feito um diagnóstico de intoxicação por plantas que contêm swainsonina num rebanho, é provável que vários animais que não apresentam sinais clínicos já estejam subcl clinicamente afetados. Portanto, em surtos de intoxicação por esse grupo de plantas, o uso da biópsia hepática pode ser indicado para identificar animais que as estejam consumindo, mas que ainda não apresentam sinais clínicos da doença.

Neste trabalho objetivou-se avaliar a técnica de biópsia hepática como um teste de valor diagnóstico para intoxicações por plantas que contêm swainsonina.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *I. marcellia* foram coletadas, secas à sombra, trituradas e acondicionadas em sacos de nylon para posterior fornecimento aos caprinos do experimento. O peso das folhas secas representou 40% das folhas verdes. A concentração de swainsonina e calysteginas nas folhas dessecadas de *I. marcellia* foi mensurada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa como previamente descrito por Gardner et al. (2001).

No experimento foram utilizados oito caprinos machos; clinicamente sadios, com idade entre 6-9 meses e peso entre 16-21 kg. Desses animais coletou-se sangue e o soro foi destinado à dosagem de AST (aspartato aminotransferase), GDH (glutamato desidrogenase) e GGT (gamaglutamiltranspeptidase) para que se pudesse descartar doença hepática prévia. Trinta dias antes do início do experimento os caprinos receberam medicação antiparasitária, foram numerados ao acaso e mantidos em baias individuais, visando à adaptação e observação clínica. No início da manhã, recebiam ração comercial, suplemento mineral, feno de tifton (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação os caprinos foram distribuídos em dois grupos: Grupo I, constituído pelos Caprinos 1-6 [receberam misturadas à ração *I. marcellia* dessecada contendo 0,02% de swainsonina na dose de 4g/kg (0,8mg de swainsonina/kg) até que os primeiros sinais clínicos neurológicos fossem observados. Após isso, o fornecimento da planta foi suspenso]. O Grupo II constituiu o grupo controle, constituído pelos Caprinos 7-8, que ficaram sob as mesmas condições de manejo que os caprinos do Grupo I, porém não receberam *I. marcellia* na dieta.

Biópsias hepáticas foram realizadas no dia zero e com intervalos semanais em todos os caprinos, totalizando sete coletas em cada animal. Utilizou-se a técnica de biópsia hepática percutânea cega com agulha de Menghini. Para isso, uma agulha de Menghini foi introduzida no sentido crânio-ventral, no 11º espaço intercostal direito, no ponto de interseção com uma linha imaginária paralela à coluna vertebral, partindo da extremidade lateral da tuberosidade ilíaca. Após ultrapassar a parede torácica a agulha foi introduzida no parênquima hepático, por dois a três centímetros para que se procedesse à coleta das amostras. Em cada procedimento, as biópsias foram repetidas até se obter um fragmento de tecido com tamanho adequado para avaliação histológica. Os fragmentos oriundos das biópsias hepáticas foram fixados em formol tamponado 10%, processados rotineiramente para inclusão em parafina e cortados a três micrômetros de espessura. Após isso, as lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e submetidas à técnica de histoquímica de lectinas.

A análise histológica das lâminas coradas em HE foi realizada em microscopia de luz e as lesões observadas foram classificadas de acordo com o grau de comprometimento dos hepatócitos em grau 0 (ausência de lesões), grau 1 (discreto comprometimento do parênquima, pequena quantidade de hepatócitos com núcleo central e citoplasma contendo discreta vacuolização citoplasmática), grau 2 (comprometimento do parênquima pela presença de hepatócitos necróticos e moderada vacuolização citoplasmática) e grau 3 (maioria dos hepatócitos necróticos e intensa e difusa vacuolização citoplasmática) (Quadro 1).

Para a histoquímica de lectinas, as lâminas foram desparafinadas, hidratadas, e incubadas em peróxido de hidrogênio a 10% com metanol por 30 minutos para bloqueio de peroxidases endógenas. Após a lavagem das lâminas com água deionizada, estas ficaram submersas por 40 minutos a 96 °C em tampão citrato (pH 6,0) para a recuperação antigênica em panela de pressão digital. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado Molico® a 5 % por 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” com lectinas (Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, 94010, USA) na diluição de 2,5µg/mL em PBS, com exceção da lectina WGA, que foi diluída na proporção de 1,25µl/ml. Foram utilizadas as lectinas *Canavalia ensiformis* agglutinin (Con-A), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin-I (RCA - I), *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-1), *Triticum vulgaris* agglutinin (WGA), Succinyl-WGA (sWGA), *Griffonia simplicifolia* agglutinin 1 (GSA-1), *Pisum sativum* (PSA), *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E) e *Lens culinaris* (LCA) (Lectin Kit Biotinylated BK 1000 e 2000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), e posteriormente incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc.) por 20 minutos. Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) (DAKO) por 5 minutos ou até atingir coloração marrom e contracolorados com hematoxilina de Harris. Para cada lâmina foi realizado um controle negativo onde se seguiram os mesmos procedimentos, porém, sem adição de lectinas.

RESULTADOS

No parênquima hepático, lesões características de doença de depósito lisossomal foram identificadas, no 7º dia de consumo da planta, em todos os caprinos que consumiram *I. marcellia* (Quadro 1). Nessa fase inicial de intoxicação, os animais não apresentaram sinais clínicos neurológicos. Porém, foram observadas lesões hepáticas que consistiram em discreto comprometimento do parênquima, pequena quantidade de hepatócitos com núcleo central e citoplasma contendo múltiplos discretas vacuolização citoplasmática (Caprinos 1 e 3) (Fig. 1B) ou lesões que consistiam em moderado comprometimento do parênquima hepático com presença de hepatócitos necróticos (Caprinos 2 e 6) (Fig. 1C).

Quadro 1. Grau de comprometimento dos hepatócitos de caprinos intoxicados experimentalmente por *I. marcellia*

Caprino nº	Dia zero	Intensidade das lesões						
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta	6ª coleta	7ª coleta
01	0	1	2	3	3*	3*	3*	2*
02	0	2	2	3	3*	3*	3*	2*
03	0	1	3	3	3*	2*	2*	1*
04	0	2	2	3	3*	3*	3*	2*
05	0	3	3	3	3*	3*	2*	2*
06	0	2	2	2	3*	3*	2*	1*
07	0	0	0	0	0	0	0	0
08	0	0	0	0	0	0	0	0

*Presença de sinais clínicos

Entre 14-21 dias de experimento foram observadas lesões mais intensas, com comprometimento significativo do parênquima hepático, maioria dos hepatócitos necróticos e intensa e difusa vacuolização citoplasmática (Fig. 1D). Um achado constantemente observado foi a presença vacúolos grandes e únicos no citoplasma dos hepatócitos, consistentes com os de lipídose hepática nos caprinos de ambos os grupos experimentais. Sinais clínicos neurológicos característicos de doença de depósito lisossomal só foram observados a partir do 27º dia de consumo da planta nos Caprinos 1-4 e 6. O Caprino 5 apresentou doença clínica a partir do 22º dia de consumo da planta. Os sinais clínicos consistiram principalmente em deficiências proprioceptivas, com alterações de equilíbrio, postura e coordenação. Emagrecimento progressivo, pelos arrepiados, opacos e quebradiços também foram observados.

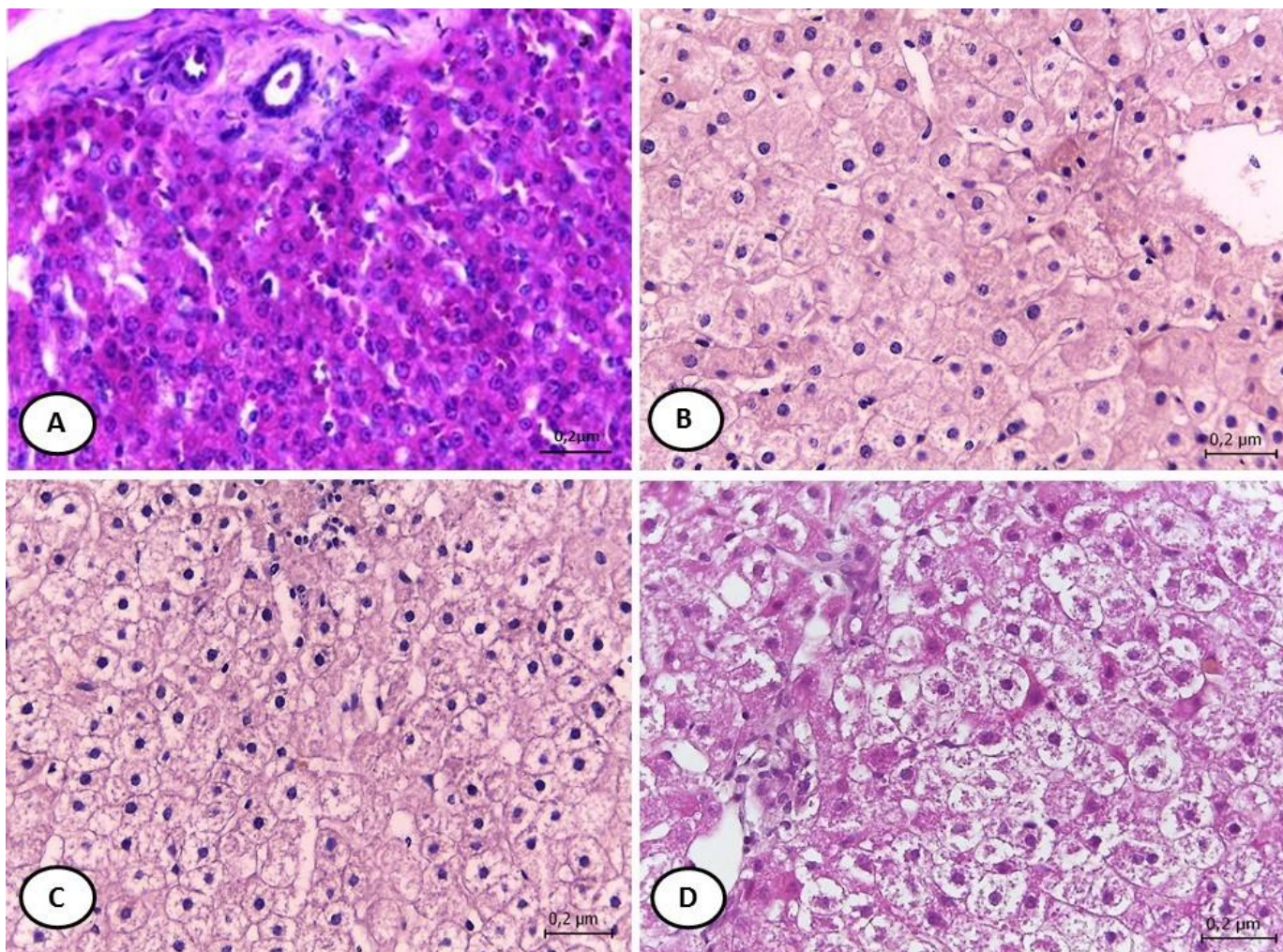


Fig.1. Doença de depósito lisossomal (DDL) induzida pelo consumo de *I. marcellia* em caprinos. Aspecto histológico das lesões hepáticas. (A) Parênquima hepático de caprino do grupo controle sem evidência de vacuolização hepática. (B) Comprometimento hepático grau 1. Pequena quantidade de hepatócitos com núcleo central e citoplasma contendo múltiplos vacúolos diminutos. (C) Comprometimento hepático grau 2. Hepatócitos necróticos e moderada vacuolização citoplasmática (D) Comprometimento hepático grau 3. Hepatócitos necróticos e intensa e difusa vacuolização citoplasmática. Coloração: HE.

Em relação à intensidade das lesões hepáticas, não houve diferença significativa quando se compararam as lâminas coradas por hematoxilina-eosina e histoquímica de lectinas. As lâminas coradas por histoquímica de lectinas apresentavam graus variáveis de marcação, desde leves a moderadas. As marcações mais intensas nos hepatócitos dos caprinos do Grupo I foram obtidas com as lectinas Con-A e WGA (Fig 2A e 2C) quando comparadas ao controle negativo (Fig. 2B). As lectinas RCA, PNA e DBA mostraram moderada reatividade. As lectinas PSA, UEA I, s-WGA e GSA I apresentaram reatividade leve. As lectinas PHA-E e LCA não apresentaram marcação. As áreas de vacuolização hepatocelular consistentes com lipidose hepática não apresentaram reatividade para as lectinas utilizadas.

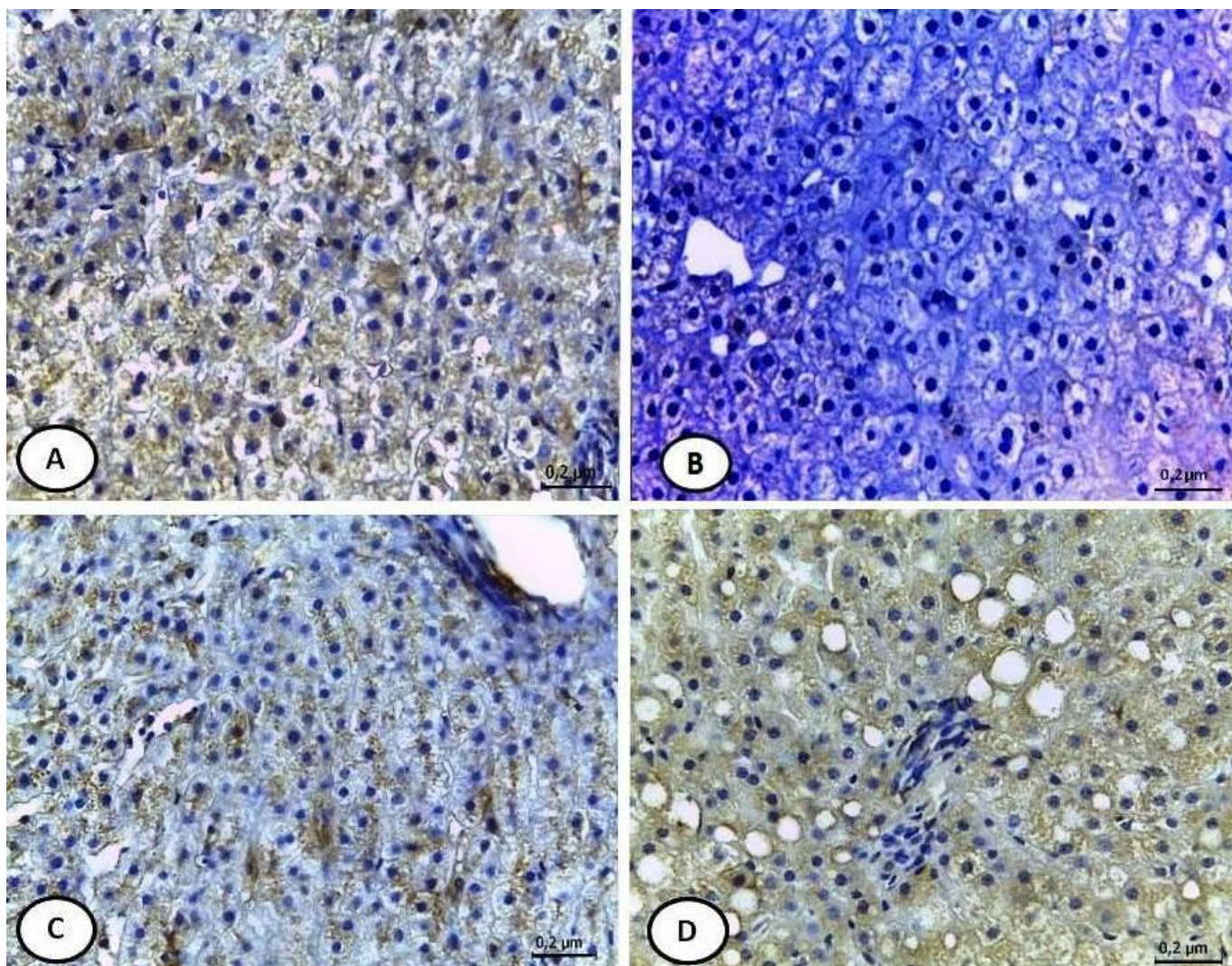


Fig.2. Doença de depósito lisossomal (DDL) induzida pelo consumo de *I. marcellia* em caprinos. Aspecto histológico das lesões hepáticas marcadas com lectinas. (A) Acentuada reatividade para a lectina Con-A em biópsia hepática com comprometimento grau 2. (B) Controle negativo com ausência de reatividade em hepatócitos. (C) Acentuada reatividade para a lectina WGA em biópsia hepática com comprometimento grau 1. (D) Acentuada reatividade para a lectina Con-A em biópsia hepática com comprometimento grau 2 com a presença de vacúolos de lipídose hepatocelular (não reativos).

DISCUSSÃO

No semiárido nordestino, caprinos que consomem *I. carnea* subsp. *fistulosa* podem ser identificados por apresentarem manchas (nódos) na boca ocasionadas pela lactescência da planta (Pimentel et al. 2012). Porém, na maioria das vezes, essa avaliação é insuficiente e inespecífica por se aplicar a várias plantas lactescentes, em sua maioria, desprovidas de toxicidade. Por isso, na maioria dos casos a doença não é diagnosticada antes do aparecimento de disfunção cerebelar.

Nesse sentido, a técnica de biópsia hepática foi eficiente para identificar precocemente lesões hepáticas provocadas pela swainsonina. Ressalta-se que essas lesões puderam ser identificadas após sete dias de ingestão da planta, mesmo com concentrações baixas de swainsonina nas folhas de *I. marcellia* (0,02%). Essa eficácia é bastante importante para o diagnóstico da doença, tendo em vista que a concentração de swainsonina em outras plantas que provocam doença de depósito lisossomal podem variar muito, e.g. 0,14% e 0,11% em amostras de *I. riedelli* e *I. sericophylla* (Barbosa et al. 2006), 0,14% em *I. martii* (Riet-Correa et al. 2009) e 0,05% em *I. carnea* subsp. *fistulosa* (Adrien et al. 2013).

A intensidade variável das lesões observadas nas biópsias pode ser explicada por uma sensibilidade individual de cada animal, pois os caprinos ingeriram a mesma quantidade diária de swainsonina. Levando isso em consideração,

a técnica pode auxiliar os médicos veterinários de campo a identificar caprinos que possuem o hábito de ingerir plantas que contêm swainsonina, mas que ainda não estejam apresentando sinais clínicos neurológicos. A identificação precoce desses animais é importante, principalmente porque entre ruminantes ocorre o mecanismo de facilitação social, onde animais que não ingerem determinadas plantas passam a ingeri-las na presença de outros que as ingerem (Riet-Correa & Méndez 2007). Dessa maneira, os caprinos que apresentam doença subclínica podem ser removidos para áreas livres de plantas que contêm swainsonina para que se recuperem, evitando assim que a doença se difunda no rebanho.

Em fazendas do semiárido nordestino onde se tem o conhecimento prévio sobre a ocorrência de plantas que contêm swainsonina, a presença de vacuolização hepática em caprinos pode ser presumivelmente considerada como decorrente da ingestão de plantas que provocam doença de depósito lisossomal, visto que as lesões não se confundem com as vacuolizações presentes na hepatopatia por lipidose (McGavin & Zachary 2009). A técnica de biópsia hepática associada à histoquímica de lectinas pode ainda ser aplicada ao diagnóstico da doença em ruminantes que pastejam em áreas onde não se tem conhecimento da existência de plantas que contêm swainsonina. Porém, para confirmação sobre o tipo de armazenamento é necessária a utilização de lectinas (Mendonça et al. 2012). Em casos de suspeita de α -mannosidoses as lectinas Con-A e WGA podem ser utilizadas com segurança, pois os resultados desse experimento comprovaram que essas lectinas apresentaram maior intensidade de marcação.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a biópsia hepática é eficiente para diagnosticar a doença de depósito lisossomal entre 7-20 dias antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos em caprinos intoxicados por *I. marcellia*.

REFERÊNCIAS

- Adrien M.L., Riet-Correa G., Oliveira C.A., Pfister, J.A, Cook D., Souza E.G., Riet-Correa F. & Schild A.L. 2013. Conditioned food aversion to *Ipomoea carnea* var. *fistulosa* induced by *Baccharis coridifolia* in goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.8, p.999-1003.
- Antoniassi N.A.B., Ferreira E.V., Santos C.E.P., Arruda L.P., Campos J.L.E., Nakazato L. & Colodel E.M. 2007. Spontaneous *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) poisoning of cattle in the Brazilian Pantanal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.415- 418.
- Barbosa R.C., Riet-Correa F., Medeiros R.M.T., Lima E.F., Barros S.S., Gimeno E.J., Molyneux R.J. & Gardner D.R. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon**, v.47, p.371-379.
- Barbosa R.C., Riet-Correa F., Lima E.F., Medeiros R.M.T., Guedes K.M.R., Gardner D.R., Molyneux R.J. & Melo L.E.H. 2007. Experimental swainsonine poisoning in goats ingesting *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* (Convolvulaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.409-414.
- Colodel E.M., Driemeier D., Loretto A.P., Gimeno E.J., Traverso S.D., Seitz A.L. & Zlotowski P. 2002a. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.51-57.
- Colodel E.M. Gardner D.R., Zlotowski P. & Driemeier D. Identification of swainsonine as glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. 2002b. **Veterinary and Human Toxicology**, v.44, p.177-178.
- Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Gardner D.R., Medeiros R.M.T., Barros S.S. Anjos B.L. & Lucena R.B. 2007. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. **Toxicon**, v.49, p.111-116.
- Driemeier D., Colodel E.M., Gimeno E.J. & Barros S.S. 2000. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. **Veterinary Pathology**, v.37, p.153-159.
- Gardner D.R., Molyneux, R.J. & Ralphs M.H. 2001. Analysis of swainsonine: Extraction methods, detection and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis* spp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.10, p.4573-4580.
- Lima D.D.C.C., Albuquerque R.F., Rocha B.P., Barros M.E.G., Gardner D.R., Medeiros R.M.T., Riet-Correa F. & Mendonça F.S. 2013. Doença de depósito lisossomal induzida pelo consumo de *Ipomoea verbascoidea* (Convolvulaceae) em caprinos no semiárido de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.7, p. 867-872.
- Loretto A.P., Colodel E.M., Gimeno E.J. & Driemeier D. 2003. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.434-438.
- McGavin M.D. & Zachary J.F. **Bases da patologia em veterinária**. 2009. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. 1476p.
- Mendonça F.S., Albuquerque R.F., Evêncio-neto J., Freitas S.H., Dória R.G.S., Boabaid F.M., Driemeier D., Gardner D.R., Riet-Correa F. & Colodel E.M. 2012. Alpha-mannosidosis in goats caused by the swainsonine-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n.1, p.90-95.

- Oliveira C.A., Barbosa J.D., Duarte M.D., Cerqueira V.D., Riet-Correa F. & Riet-Correa G. 2009. Intoxicação por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em caprinos na Ilha de Marajó. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.7, p.583-588.
- Oliveira C.A., Duarte M.D., Cerqueira V.D., Riet-Correa F., Riet-Correa B., Vinhote W.M.S. & Riet-Correa G. 2010. Indução de aversão condicionada em caprinos recém adaptados a ingerir *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*. In: VI Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Patologia Animal.
- Oliveira C.A., Riet-Correa G. & Riet-Correa F. 2013. Intoxicação por plantas que contêm swainsonina no Brasil. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p.653-661, 2013.
- Pimentel L. A., Maia L.A., Campos E.M., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T., Pister J.A., Cook D. & Riet-Correa F. 2012. Aversão alimentar condicionada no controle de surtos de intoxicações por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* e *Turbina cordata*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.8, p.707-714.
- Riet-Correa F. & Méndez M. D. C. 2007. Intoxicação por plantas e micotoxinas, p.99-219. In: Riet-Correa F., Schild A. L., Lemos A. A. & Borges J. R. (Eds), **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Vol. 2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. 694p.
- Riet-Correa F., Pfister J., Schild A.L., Medeiros R.M., Dantas A.F.M. 2009. **Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock**. Santa Maria: Pallotti, 246p.

5. ANEXO

Instruções para Autores – Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação

será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em *itálico* (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.