

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ENCEFALOPATIA HEPÁTICA POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS E
TUBERCULOSE NO SISTEMA NERVOSO DE BOVINOS**

ALINE MONTEIRO SILVEIRA

PATOS-PB
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ENCEFALOPATIA HEPÁTICA POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS E
TUBERCULOSE NO SISTEMA NERVOSO DE BOVINOS**

Mestranda: Aline Monteiro Silveira
Orientador: Franklin Riet-Correa

PATOS-PB
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

S587e Silveira, Aline Monteiro
Encefalopatia hepática por *Tephrosia cinerea* em ovinos e tuberculose no sistema nervoso de bovinos / Aline Monteiro Silveira. – Patos, 2017.
58f.

Dissertação (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2017.

“Orientação: Prof. Dr. Franklin Riet-Correa”.

Referências.

1. Plantas hepatotóxicas. 2. Distúrbios neurológicos. 3. Degeneração esponjosa. 4. Ruminantes. I. Título.

CDU 591.2:636.2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ENCEFALOPATIA HEPÁTICA POR *Tephrosia cinerea* EM OVINOS E
TUBERCULOSE NO SISTEMA NERVOSO DE BOVINOS**

Dissertação de Mestrado elaborada por
ALINE MONTEIRO SILVEIRA

Aprovada em / / .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas
UAMV da UFCG/CSTR/HV - PATOS/PB

Prof.^a Dr.^a Lisanka Ângelo Maia
IFPB - SOUSA/PB

Prof.^a Dr.^a Tatiane Rodrigues da Silva
UAMV da UFCG/CSTR/HV - PATOS/PB

PATOS-PB
2017

Dedicatória

A vida, aos animais, a minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

Não há como não agradecer, primeiramente, ao Ser Iluminado que nos dar forças diariamente para levantar e ir à busca do que desejamos independente de religião.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em toda e qualquer decisão, e aguentaram fortemente toda a saudade e sempre me confortaram. A minha avó, muito sábia em suas palavras, dentre tantas outras coisas, me dizia para crer e eu conseguiria... E olha só, consegui! Ao meu irmão, que apesar da distância, sempre se fez presente em todos os momentos, fáceis ou não. À minha família inteira, tios e primos, por me aturarem, não somente pelo fato de ser família, mas por ter muito amor envolvido!

À minha companheira de casa, amiga, parceira, que se tornou um parente bem próximo, nesse sertão tão grande, Nayadjala (carinhosamente, Nay - A coisa), que, apesar do desconhecimento do que iria enfrentar dividindo teto comigo, sempre aceitou todas as loucuras, incluindo um gato com alguns problemas a serem estudados, noites em claro e solução de casos.

Aos meus animais, Logan (que veio como um presente), Rick, Zeus e Bob, pelo de sempre. Lampião, Ariano e Mussum, pela participação nesta pesquisa, que foi imprescindível para a conclusão.

Ao Prof. Franklin Riet-Correa, por ter confiado a mim uma orientação. E mesmo numa certa distância de Patos, me ensinou a maior lição que eu poderia receber em meu mestrado: **sempre é possível, apesar das dificuldades** e toda **boa sorte é sempre** bem-vinda! Serei eternamente grata.

Ao sertão paraibano, que me possibilitou crescer e aprender, mostrou uma realidade antes desconhecida e beleza de uma imensidão que nunca pude imaginar. Inclusive, uma dessas maravilhas, foi a criação e fortificação de amizades com pessoas incríveis, como Eriquinha (dando um tchan sempre que possível), Roana (permitindo-me), Édipo (meu eterno consultor), Eduardo (minha lembrança de litoral), Raquel (risos, comidas, risos e felinos), Jeffens (beber qualquer líquido nunca mais será a mesma coisa), Davi (desde o nascer do sol, até o próximo nascer do sol), Saul (divar é preciso), Emílio (GoT forever), Marcelo (parceria na certa), Tuti (agregada), Agrício (por todo o turismo por fotografia), Mael (conhecido), Bel (a loucura é saudável), Rodrigo (o que é que você disse????), Hay

(beleza interior e exterior numa só pessoa), Millena (foco, força e fé), Lisanka (uma consciência sempre presente), Gian (altos papos sobre batons, músicas e brejas), Carol (por me ensinar que nada demais é normal), Talles (por toda a educação), Mikael, Júlio e Daniel (muuuuito conhecimento), Glauco (por ter segurado a barra em tão pouco tempo para a conclusão da pesquisa), Ernani e Fernanda (2x) (amizade e disciplina, Kaa), Rômulo (pelas tecnologias, de verdade).

A todos os componentes da Clínica Médica de Grandes e Pequenos Animais, aos residentes e Professores! Sei que dei trabalho e agradeço a paciência!

Ao Seu Zé, a Zé e ao Seu Coité. Sem palavras para descrever a importância de cada um neste trabalho. À Prof. Verônica, com toda a sua sabedoria, me deu a liberdade de autoconhecimento acadêmico e pessoal! A todos do Laboratório de Patologia Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A **todos** os componentes do Laboratório de Patologia Animal (LPA), da Universidade Federal de Campina Grande, pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ainda, aos *papeamentos* de várias noites, com um grande amigo e veterinário (dentre outras tantas funções que ele exerce na vida), Sávio Martins, que, numa conversa sobre mudanças, disse-me que todos *nós* somos **calangos**. Sim, **calangos**, pois estes animais, que habitam há séculos o sertão, mantêm-se em sua forma exterior primitiva, entretanto adaptada. Esta adaptação não ocorreu de forma clara para visualização macroscópica, mas de fato ocorreram mudanças, e estas foram mudanças interiores, possivelmente psicológicas. As mudanças só ocorrem para um único efeito final: SOBREVIVÊNCIA! Pois, o organismo se adapta ou morre. Não se produzem mudanças sem interferência externa, moldada pelo tempo, ambiente e convívio social. Logo, todos os agradecimentos aqui, envolveram pessoas muito queridas e amadas, que fizeram parte (uma boa parte) de toda mudança que aconteceram nestes dois anos de mestrado e me fizeram alcançar este objetivo.

Obrigada a todos vocês! Do fundo do meu coração!

RESUMO

Esta dissertação é formada por dois capítulos. No primeiro descreve-se encefalopatia hepática na intoxicação por *Tephrosia cinerea*, planta que causa fibrose hepática periácinar em ovinos na região semiárida do Nordeste com quadro clínico de ascite acentuada. Numa revisão de fichas de necropsia e lâminas histopatológicas no Laboratório de Patologia Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, do Campus de Patos, constatou-se que em nove surtos, dos quais houve um total de 16 necropsias, seis ovinos apresentavam descrição de sonolência como queixa clínica e apresentavam alterações encefálicas que eram caracterizadas por vacuolização da substância branca e junção entre a substância branca e cinzenta, e presença de astrócitos de Alzheimer tipo II, principalmente nos cortes de núcleos da base, pedúnculo cerebelar, colículos, tálamo e córtex. Todos os ovinos apresentavam diferentes graus de fibrose hepática, que eram melhor evidenciadas na coloração de tricômico de Masson. Para averiguação da integridade vascular no encéfalo dos animais realizou-se coloração de ácido periódico de Schiff, em que nenhuma alteração foi visualizada. Para constatação de degeneração astrocitária, foi realizada imuno-histoquímica com anticorpo anti-GFAP, sendo que quatro ovinos evidenciaram fraca ou ausência de marcação. Enquanto que o anticorpo anti-S100 marcou o citoplasma de astrócitos reativos em 6 ovinos. A reprodução experimental resultou em dois animais intoxicados com encefalopatia hepática apresentando sinais clínicos, lesões histopatológicas e achados imuno-histoquímicos semelhantes aos relatados nas intoxicações naturais. Podendo-se concluir que alguns casos de falência hepática grave, secundários a intoxicação por *T. cinerea*, o aumento dos níveis séricos de amônia provoca distúrbios astrocitários que evoluem para quadro de encefalopatia hepática em ovinos, devendo-se incluir esta doença como diagnóstico diferencial de doenças do sistema nervoso de ovinos.

O segundo capítulo consta-se da descrição de seis surtos de tuberculose no sistema nervoso de bovinos. Os casos foram necropsiados na instituição previamente citada, onde, num total de 73 necropsias de bovinos com tuberculose, seis evidenciaram lesões no sistema nervoso, e apenas três desses apresentaram sinais clínicos neurológicos diversos, variando com a localização e gravidade das lesões. Todos os seis animais eram de raças distintas e eram mantidos sob regime semi-extensivo, e a maioria tinha idade superior a 12 meses. Durante a

necropsia observou-se que cinco dos seis bovinos apresentavam lesões em outros órgãos, além do sistema nervoso. Em quatro animais a lesão macroscópica era caracterizada por espessamento da leptomeninge da região basilar do encéfalo, em um animal havia ainda a presença de granulomas na parede do ventrículo e, num outro animal, havia formação de um tubérculo na base do cerebelo, provocando herniação cerebelar e hidrocefalia secundária; em dois animais a lesão estendia-se à medula espinhal sacral. Microscopicamente as alterações consistiam em granulomas, com centro necrótico, raramente mineralizado, envolto por macrófagos e células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans, nos casos em que não havia sinais clínicos os granulomas comprimiam o neuropilo adjacente ou o infiltravam de forma discreta, enquanto que nos casos com distúrbios clínicos o tecido adjacente aos granulomas apresentava malácia. Quando realizada a coloração de tricrômico de Masson, notou-se que havia escassez ou não havia cápsula fibrosa delimitando as lesões no sistema nervoso, além disso, nesta mesma coloração evidenciou-se proliferação marcada da túnica íntima dos vasos das leptomeninges. Na coloração de Von Kossa, constatou-se a pouca mineralização intralésional e áreas de mineralização no neuropilo íntegro de um dos bovinos. Em todos os bovinos eram encontrados inúmeros bacilos álcool-ácidos resistentes na coloração de Ziehl Neelsen e forte a moderada imunomarcação com o anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis*. Os achados macroscópicos e as lesões vasculares nos casos de tuberculose bovina afetando o sistema nervoso sugerem que a bactéria se dissemine no organismo através da via hematogena, a partir das lesões em sítios primários (como o pulmão). A localização das lesões na maioria dos casos sugere ainda que o ciclo de Willis favoreça a instalação das bactérias, por haver alteração do fluxo sanguíneo nesta estrutura.

Palavras-chave: Plantas hepatotóxicas, distúrbios neurológicos, degeneração esponjosa, *Mycobacterium* sp., ruminantes.

ABSTRACT

This dissertation consists of two chapters. The first describes hepatic encephalopathy in poisoning by *Tephrosia cinerea*, plant that causes hepatic fibrosis periacinar in sheep in semi-arid region of Northeast with clinical signal of ascites. In a review of autopsy and histopathological slides in Animal Pathology Laboratory of the Federal University of Campina Grande, Patos Campus, it was found that in nine outbreaks, of which there were a total of 16 children, six sheep had description of drowsiness as a complaint and had brain changes that were characterized by white matter vacuolation and the junction between gray and white matter, and the presence of Alzheimer type II astrocytes, primarily nuclei of the base, cerebellar peduncle, colliculus, thalamus and cortex. All sheep showed varying degrees of hepatic fibrosis, which were best evidenced on tricômico staining of Masson. For investigation of vascular health in the brain of animals held periodic acid Schiff staining, in which no changes have been displayed. For finding astrocytic degeneration, immunohistochemistry was performed with anti-GFAP antibody, and four sheep showed low or absence of markup. While the antibody anti-S100 marked the cytoplasm of reactive astrocytes in 6 sheep. The experimental breeding resulted in two animals intoxicated with hepatic encephalopathy showing clinical signs, histopathological lesions and immunohistochemical findings similar to those reported in the natural poisoning. Concluding that some cases of severe liver failure, poisoning side *T. cinerea*, increased serum levels of ammonia causes astrocytic disorders that evolve into framework of hepatic encephalopathy in sheep, and include this disease as differential diagnosis of nervous system diseases of sheep. The second chapter is the description of six outbreaks of tuberculosis in the nervous system of cattle. The cases were necropsied on previously cited institution, where a total of 73 necropsies of cattle with tuberculosis, six showed lesions in the nervous system, and only three of these clinical neurological signs several, varying with the location and severity of the lesions. All six animals were of different breeds and were kept under a semi-extensive regimen, and most were older than 12 months. During the necropsy showed that five of the six cattle presented lesions in other organs besides the nervous system. In four animals to macroscopic lesions were characterized by thickening of the leptomeningeal in the brain's basilar region, in an animal there was still the presence of

granulomas in the wall of the ventricle and in another animal, there was the formation of a tubercle at the base of the cerebellum, causing cerebellar herniation and secondary hydrocephalus; in two animals the lesion extended the sacral spinal cord. Microscopically the changes consisted of granulomas, with necrotic center, rarely mineralized, enveloped by macrophages and multinucleated giant cells of the type Langehans, in cases without clinical signs the granulomas were compressed the adjacent neuropilo or they infiltrated it discreetly, while in cases with clinical disorders tissue adjacent to the granulomas showed malacia. When held the coloration of tricomie Masson, noticed that there was a shortage or there was no fibrous capsule delimiting the lesions in the nervous system, moreover, in this same coloration showed marked proliferation of vessel intimate tunic of the leptomeninges. In Von Kossa staining, showed the little intralesional mineralization in areas of whole neuropilo in one of the cattle. In all cattle were found numerous alcohol-resistant acid bacilli in Ziehl Neelsen staining and strong to moderate immunolabeling with anti-*Mycobacterium tuberculosis*. The macroscopic findings and vascular lesions in cases of bovine tuberculosis affecting the nervous system suggests that the bacteria spreading in the body through hematological ways, beginning from injuries in primary sites (such as the lungs). The location of the lesions in most cases suggests that the cycle of Willis encourages the installation of bacteria, because blood flow changes may happen in this structure.

Keywords: Plants hepatotoxic, neurological disorders, spongy degeneration, *Mycobacterium* sp., ruminants.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I	19
Encefalopatia hepática secundária a intoxicação espontânea e experimental por <i>Tephrosia cinerea</i> em ovinos	19
RESUMO	21
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO II	37
Caracterização epidemiológica, clínico-patológica e histoquímica da tuberculose no sistema nervoso central de bovinos no semiárido da Paraíba	37
RESUMO	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
ANEXOS	54

LISTA DE QUADROS

Capítulo I: Encefalopatia hepática secundária a intoxicação espontânea e experimental por *Tephrosia cinerea* em ovinos

Quadro 1: Origem dos anticorpos primários, diluições, recuperações antigênicas e cromógeno utilizados na imuno-histoquímica 35

Quadro 2: Dados epidemiológicos dos ovinos intoxicados espontaneamente pela *T. cinerea* 35

Quadro 3: Grau da fibrose no fígado e presença de astrócitos de Alzheimer tipo II e vacuolização no encéfalo de ovinos intoxicados espontaneamente pela *T. cinerea*..... 36

Capítulo II: Caracterização epidemiológica, clínico-patológica e histoquímica da tuberculose no sistema nervoso central de bovinos no semiárido da Paraíba

Quadro 1: Raça, sexo, idade, sinais clínicos e localização das lesões em seis casos de bovinos com lesões de tuberculose no sistema nervoso 52

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Encefalopatia hepática secundária a intoxicação espontânea e experimental por *Tephrosia cinerea* em ovinos

Fig 1: Intoxicação natural por *Tephrosia cinerea* em ovinos. A) Cavidade abdominal evidenciando ascite e discretos *shunts* porto-sistêmicos (ovino 16). B) Acentuada fibrose periacinar, com formação de pontes (ovino 2). Tricômico de Masson, Obj 4. C) Junção entre substância branca e cinzenta de córtex com marcada vacuolização nas junções entre as substâncias (ovino 12). Hematoxilina e eosina, Obj 20. D) Substância cinzenta de córtex evidenciando astrócitos de Alzheimer tipo II (seta) (ovino 2). Hematoxilina e eosina, Obj 40. 32

Fig 2: Junção entre substância branca e cinzenta de córtex de ovino intoxicado espontaneamente por *Tephrosia cinerea*. Realçados pelas setas, observa-se astrócitos de Alzheimer tipo II com fraca ou ausência de marcação citoplasmática (seta) (ovino 6). Imunomarcção anti-GFAP, método estreptavidina-biotina-peroxidase. Cromógeno DAB, Obj. 40. 33

Fig 3: Junção entre substância branca e cinzenta de córtex de ovino intoxicado espontaneamente por *Tephrosia cinerea*. Imunomarcção anti-S100 em astrócitos (seta) (ovino 12), método estreptavidina-biotina-peroxidase. Cromógeno DAB, Obj. 40. 33

Fig 4: Níveis de, ureia, AST, GGT e albumina do grupo experimental de ovinos E1 e E2 intoxicados experimentalmente por *T. cinerea* e ovino controle E3. Os valores de referência normal para ureia são 17,12-42,8 mg/dL, para AST 60-280 U/L, para GGT 20-52 U/L e para albumina 2,4-3 g/dL. 34

Capítulo II: Caracterização Epidemiológica, Clínico-Patológica e Histoquímica da Tuberculose no Sistema Nervoso Central de Bovinos no Semiárido da Paraíba

Fig 1: Tuberculose neurológica em bovinos. A) Encéfalo apresentando espessamento das leptomeninges na região basilar (Bovino 2). B) Medula cervical com espessamento das meninges (Bovino 5). C) Encéfalo com herniação cerebelar e presença de massa protrusa na base do cerebelo (seta) (Bovno 4). D) Corte do encéfalo evidenciando projeções na parede do ventrículo lateral esquerdo (Bovino 2) (seta). 50

Fig 2: Tuberculose neurológica em bovinos. A) Pedúnculo cerebelar observa-se espessamento das leptomeninges por múltiplos granulomas com áreas necróticas centrais (Bovino 4). HE. Obj.10 B) Córtex frontal com granuloma meningeano comprimindo o neurópilo adjacente (Bovino 2). HE, Obj. 5x. C) Ponte, mineralização do tecido nervoso (Bovino 2). HE. Obj. 10. Em detalhe, coloração de Von Kossa, demonstrando as áreas mineralizadas em tom enegrecido. D) Córtex cerebral, bastonetesalcohol-ácido resistentes, intracitoplasmáticos em célula gigante multinucleada do tipo Langerhans e em macrófagos em meioa lesão (Bovino 5). Ziehl-Neelsen. Obj. 100. E) Córtex cerebral, vaso meningeano evidenciando túnica íntima acentuadamente proliferada em tom de azul e com redução do diâmetro do lúmen (Bovino 6). Tricrômico de Masson. Obj. 20. F) Córtex cerebral, imunomarcação positiva com anti-*Mycobacteriumtuberculosis* no citoplasma de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas (Bovino 4). Cromógeno DAB, Obj. 40. 51

INTRODUÇÃO

Prejuízos econômicos para os produtores rurais podem ser ocasionados por intoxicações por plantas (RIET-CORREA et al. 2011), entretanto, doenças infecciosas também causam perdas importantes por baixa produtividade e morte dos animais (GALIZA et al. 2010). Na região Nordeste, onde a produção de ruminantes é uma fonte de renda primária de subsistência para a maior parte da população, são necessários estudos acerca das doenças que acometem estes animais, para que métodos de tratamento e controle sejam implantados e as perdas sejam reduzidas. Doenças do sistema nervoso central (SNC) são graves e possuem ambas etiologias acima citadas, além disso, podem culminar em baixa produtividade e morte dos animais.

Plantas tóxicas ocasionalmente provocam lesões diretas ao SNC, outras, causam danos secundários, como é o caso da intoxicação por *Crotalaria retusa* em equinos (NOBRE et al. 2004) e *Senecio brasiliensis* em bovinos (KARAM et al. 2001), as quais, após causarem falência hepática grave, há um quadro de hiperamonemia, que desenvolverá, secundariamente, a encefalopatia hepática nos animais intoxicados. Outras plantas que possam lesionar o fígado gravemente, possuem potencial para desenvolver a encefalopatia hepática nos animais susceptíveis (SUMMERS et al. 1994; KARAM et al. 2001). Entretanto, apesar da *Tephrosia cinerea* provocar lesões hepáticas graves, não foi reportado alterações encefálicas na intoxicação (SANTOS et al. 2007, RIET-CORREA et al. 2013).

A leguminosa *Tephrosia cinerea* é abundante em áreas de baixios na Paraíba e frequentemente ocasiona morte de ovinos em período de seca (SANTOS et al. 2007). O princípio tóxico da planta é desconhecido. A intoxicação causa fibrose periacinar e capsular, formando pontes, que ocasiona uma disfunção na pressão hidrostática sanguínea, com conseqüente extravasamento de líquido dos vasos para a cavidade abdominal, causando ascite, caracterizando popularmente a doença como “barriga d’água” (RIET-CORREA et al. 2013). Além disso, nos animais intoxicados é possível a visualização macroscópica de *shunts* porto-sistêmicos, com desvios sanguíneos dos vasos mesentéricos e veia porta para a veia cava abdominal.

1 Dos distúrbios infecciosos, de longe a raiva é a principal doença para os ruminates,
2 entretanto, outras doenças infecciosas ocorrem de forma esporádica, como é o caso da
3 infecção pelo *Mycobacterium*. A tuberculose bovina, apesar de frequente no rebanho
4 nacional, não apresenta sinais clínicos bem definidos e é caracterizada por ser uma doença
5 crônica, debilitante, cursando com perda de peso e raramente evolui para a morte do
6 animal. A maioria dos relatos da tuberculose no sistema nervoso são casos isolados ou
7 relatos específicos (ORUÇ 2005; GALIZA et al. 2010; BORGES et al. 2013), dificilmente
8 são retratados estudo de casos (KONRADT et al. 2016) e neles não há caracterização da
9 lesão.

10 Nesta dissertação é dividida em dois capítulos, o primeiro trabalho relata-se os
11 aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da encefalopatia hepática em ovinos
12 intoxicados por *T. cinerea* em nove surtos naturais e a reprodução experimental da doença.
13 O segundo trabalho exhibe a epidemiologia, sinais clínicos e patologia da tuberculose
14 acometendo o sistema nervoso central de bovinos.

15 REFERÊNCIAS

- 16 BORGES, P. C.; NAKAGAKI, K. Y. R.; LOPES, P. R. F.; SOUZA, B.; UTIUMI,
17 K.&RAYMUNDO, D. L. Tuberculose meningeana e na forma de tubérculos isolados
18 no sistema nervoso central de uma novilha holandesa. *Archives of Veterinary Science*,
19 v. 12, n. 2, p.185-187, 2013.
- 20 GALIZA, G. J. N.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D.&RIET-
21 CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino.
22 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 267-276, 2010.
- 23 KARAM, F. C.; SCHILD, A. L.; MELLO, J. R. B. Intoxicação por *Senecio spp.* em
24 bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais favoráveis e medidas de
25 controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 7, p. 603-309, 2011.
- 26 KONRADT, G.; BASSUINO, D.M.; BIANCHI, M.V.; BANDINIELLI, M.B.;
27 DRIEMEIER, D. &PAVARINI, S.P. Neurotuberculosis in cattle in southern Brazil.
28 *Tropical Animal Health Production*, v. 48, n. 5, p. 1089-1094, 2016.
- 29 NOBRE, V.M.T.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J.M.; DANTAS, A.F.M.;
30 TABOS, I.M. & VASCONCELOS, J.S. 2004. Intoxicação por *Crotalaria retusa*
31 (Fabaceae) em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.
32 24, n 3, p. 132-143, 2004.

- 1 ORUÇ, E. Meningoencephalitis tuberculosa in a holstein cow. *Veterinary Pathology*, v.42,
2 p. 856-858, 2005.
- 3 RIET-CORREA, F.; BEZERRA, C. W. C.; MEDEIROS, R. M. T. Plantas tóxicas do
4 Nordeste. Patos: INCT, 2011. 79 p.
- 5 RIET-CORREA, F.; CARVALHO, K. S.; RIET-CORREA, G.; BARROS, S. S.; SIMÕES,
6 S. V. D.; SOARES, M. P.; MEDEIROS, R. M. T. Periacinar liver fibrosis caused by
7 *Tephrosia cinerea* in sheep. *Veterinary Science*, v.95, p. 200-203, 2013.
- 8 SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M. D.; BARROS, S. S.;
9 MOLYNEUX, R. J.; MEDEIROS, R. M. T.; SOLVA, D. M.; OLIVEIRA, O. F.
10 Toxic hepatopathy in sheep associated with the ingestion of the legume *Tephrosia*
11 *cinerea*. *Investigation Journal of Veterinary Diagnostic*, v. 19, p.690-694, 2007.
- 12 SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. Degenerative diseases of the
13 central nervous system. In: SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A.
14 *Veterinary Neuropathology*. St. Louis: Mosby, 1994. P. 208-210.

CAPÍTULO I

**Encefalopatia hepática secundária a intoxicação espontânea e experimental por
Tephrosia cinerea em ovinos**

Trabalho submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

1 **Encefalopatia hepática secundária à intoxicação espontânea e experimental por**
 2 ***Tephrosia cinerea* em ovinos¹**

3 Aline M. Silveira^{2*}, Édipo M. Campos², Fernando Vaz², Cíntia de Lorenzo³, David
 4 Driemeier³, Fernando Furlan⁴, Antonio F.M. Dantas², Franklin Riet-Correa^{2,5}

5 **ABSTRACT:** Silveira A.M., Campos E.M., Vaz F., Lorenzo C., Driemeier D., Furlan F.,
 6 Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2016. [**Hepatic encephalopathy secondary to**
 7 **spontaneous and experimental poisoning by *Tephrosia cinerea* in sheep**] Encefalopatia
 8 hepática secundária à intoxicação espontânea e experimental por *Tephrosia cinerea* em
 9 ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Animal,
 10 Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária,
 11 S/N, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mail: silveira.a.monteiro@gmail.com.

12 In the semiarid region of northeastern Brazil, in sheep, *Tephrosia cinerea* causes
 13 periacinar hepatic fibrosis with severe ascites and, occasionally, nervous signs. Sixteen
 14 sheep from nine outbreaks of *T. cinerea* poisoning were studied. All sheep had histologic
 15 lesion of periacinar fibrosis and six showed, in the brain, vacuolization (spongy
 16 degeneration) of the white matter and junction between grey and white matter and presence
 17 of Alzheimer type II astrocytes in the grey matter. The disease was produced
 18 experimentally in two sheep, that presented porto systemic shunts and similar histologic
 19 lesions than those observed in the spontaneous cases. Immunohistochemistry revealed weak
 20 labelling with anti-GFAP antibodies suggesting a degenerative alteration of the astrocytes
 21 with accumulation of dense bodies and reduction of the GFAP. There was strong labelling
 22 with anti-S100 antibodies suggesting cellular reactivity with proliferation of mitochondria
 23 and endoplasmatic reticulum. Such alterations are characteristic of the effects caused by

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

²Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande (UFCCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58708-110, Brasil. *Autor para correspondência: silveira.a.monteiro@gmail.com.

³Setor de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS, 90540-000, Brasil.

⁴Laboratório de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, Universidade Federal do Mato Grosso, Avenida Fernando Correa da Costa, 2367, Cuiabá, MT, 78060-900, Brasil.

⁵Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia, Uruguay. franklin.riet@pq.cnpq.br, frcorrea@inia.org.uy.

1 ammonia in the astrocytes. It is concluded that in the poisoning by *T. cinerea* nervous signs
2 due to hepatic encephalopathy occurs in some sheep.

3 INDEX TERMS: Hepatotoxic plants, neurological disorders, status spongiosus, GFAP,
4 S100, poisonous plants, sheep.

5

6 **RESUMO:** A intoxicação por *Tephrosia cinerea* causa fibrose hepática periacinar em
7 ovinos na região semiárida do Nordeste, com quadro clínico de ascite acentuada, e,
8 ocasionalmente, com sinais neurológicos. Neste trabalho foram estudadas 16 ovinos em
9 nove surtos de intoxicação por *T. cinerea*. Todos os ovinos apresentaram lesões
10 histológicas de fibrose periacinar e seis apresentaram, no encéfalo, vacuolização da
11 substância branca e da junção entre a substância branca e a cinzenta com presença de
12 astrócitos de Alzheimer tipo II na substância cinzenta. A doença foi reproduzida
13 experimentalmente em dois ovinos que apresentaram ascite, desvios vasculares (*shunts*)
14 porto-sistêmicos e sinais nervosos com lesões histológicas semelhantes à dos casos
15 espontâneos. Na técnica de imuno-histoquímica houve marcação fraca ou ausente do
16 citoplasma astrocitário para o anticorpo anti-GFAP em seis ovinos evidenciando uma
17 alteração degenerativa, em que os astrócitos acumulam corpos densos e reduzem o volume
18 de GFAP. Houve marcação positiva para o anticorpo anti-S100 em oito ovinos, incluindo
19 os dois animais experimentais o que sugere reatividade celular, com proliferação
20 mitocondrial e de retículo endoplasmático liso. Estas alterações são características dos
21 efeitos da amônia nos astrócitos. Conclui-se que na intoxicação por *T. cinerea* em alguns
22 ovinos ocorrem sinais nervosos em consequência da encefalopatia hepática.

23

24 TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas hepatotóxicas, distúrbios neurológicos, degeneração
25 esponjosa, intoxicação por plantas, ovinos.

26

27

INTRODUÇÃO

28 A encefalopatia hepática é uma alteração clínica visualizada em animais com falência
29 hepática (Wouters et al. 2013). Em equinos foram descritos casos de encefalopatia hepática
30 secundários a intoxicação por *Crotalaria retusa* (Nobre et al. 2004) e na intoxicação por
31 *Trema micrantha* em equinos (Bandarra et al. 2011) e em caprinos (Traverso et al. 2003) e

1 ainda na intoxicação por *Senecio* spp. em ovinos (Ilha et al. 2001) e em bovinos (Rissi et al.
2 2010). As lesões no fígado causam decréscimo na metabolização de substâncias, como a
3 amônia, que pela via hematogena atinge o encéfalo causando alterações visualizadas
4 microscopicamente como vacuolização na substância branca (*status spongiosus*) e presença
5 de astrócitos de Alzheimer tipo II em diversas regiões encefálicas (Wouters et al. 2013,
6 Kinde et al. 2014). Atualmente, apesar de ser conhecido o distúrbio hepático provocado
7 pela intoxicação por *Tephrosia cinerea* em ovinos, não foi descrita qualquer alteração
8 encefálica associada (Santos et al. 2007, Riet-Correa et al. 2013).

9 A leguminosa *Tephrosia cinerea* é frequente na região Nordeste do Brasil. Em épocas de
10 seca causa intoxicação em ovinos que pastoreiam em áreas invadidas por esta planta
11 (Santos et al. 2007). A doença se caracteriza por fibrose periacinar, com hipertensão portal
12 e aumento da pressão hidrostática intra-hepática, provocando ascite e caracterizando
13 popularmente a doença como “barriga d’água” (Riet-Correa et al. 2013).

14 Objetiva-se com este trabalho caracterizar os aspectos histoquímicos e imuno-
15 histoquímicos da encefalopatia hepática secundária a intoxicação espontânea e
16 experimental por *T. cinerea* em ovinos.

17 MATERIAL E MÉTODOS

18 Foram estudados nove surtos, ocorridos entre os anos de 2003 a 2015, de intoxicação
19 espontânea por *Tephrosia cinerea* em ovinos, diagnosticados no Laboratório de Patologia
20 Animal (LPA) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande
21 (UFCG), Campus de Patos, Paraíba. Os dados epidemiológicos, sinais clínicos e período da
22 ocorrência foram obtidos a partir dos laudos de necropsia.

23 Durante a necropsia desses ovinos foram coletados e fixados em formol tamponado a
24 10% fragmentos de fígado, pré-estômagos, abomaso, intestinos, rim, adrenal, linfonodos,
25 pulmão e coração, assim como o sistema nervoso central. Após a fixação foram realizados
26 cortes transversais do encéfalo e amostras das regiões de córtex, núcleos da base,
27 hipocampo, tálamo, colículos, pedúnculos cerebelares, cerebelo e ponte, estas amostras
28 juntamente com as dos demais órgãos supracitados foram processadas rotineiramente para
29 histologia e confeccionadas lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Lâminas dos
30 fígados de todos os ovinos dos respectivos surtos foram coradas pelo tricrômico de Masson
31 para evidenciar o tecido fibroso. Nas lâminas do encéfalo foram realizadas colorações de

1 ácido periódico de Schiff, para confirmação da integridade vascular. Para realização da
2 imuno-histoquímica (IHQ) foram selecionadas secções de córtices, núcleos da base,
3 colículos e pedúnculos cerebelares dos ovinos, realizada pela técnica estreptavidina-biotina-
4 peroxidase (LSAB-HRP), utilizando os anticorpos anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP),
5 para detecção de astrócitos degenerados, e anti-proteína S100, para identificação de
6 astrócitos reativos (Quadro 1). Como controle negativo foram utilizadas às mesmas secções
7 a serem testadas, com a substituição do anticorpo primário por diluente de anticorpo.

8 Para a reprodução experimental da doença, a *T. cinerea* foi colhida no período de julho a
9 setembro de 2015 em uma propriedade do município de Patos, Paraíba, onde tinha ocorrido
10 um surto de intoxicação por essa planta no ano de 2012. Após a coleta, a planta foi seca à
11 sombra por um período de sete dias e, posteriormente, triturada e armazenada em sacos
12 plásticos à temperatura ambiente. Foram selecionados três ovinos, mestiços, oriundos de
13 propriedades livres de *T. cinerea*. Os ovinos E1 (10 meses, 23,1Kg) e E2 (9 meses, 21Kg)
14 consumiram a planta *ad libitum*, por um período de 30 e 96 dias respectivamente. O ovino
15 E3 (9 meses, 23Kg) foi utilizado como animal controle e recebeu feno de capim tifton
16 (*Cynodon dactylon*) *ad libitum*. Os três ovinos receberam, adicionado ao volumoso,
17 concentrado em quantidade equivalente a 1% do peso vivo e água à vontade.

18 Durante o período experimental, os ovinos foram alojados em baias individuais e eram
19 submetidos à avaliação clínica diariamente. Amostras de sangue foram coletadas no
20 primeiro dia do experimento e a cada sete dias durante todo o período experimental. As
21 avaliações séricas dos níveis de γ -glutamil transferase (GGT), aspartatoamino transferase
22 (AST), albumina e ureia foram realizadas pelo método cinético enzimático e colorimétrico,
23 de acordo com metodologia descrita no analisador bioquímico automático Roche®, modelo
24 Cobas c-111.

25 Os ovinos E1 e E2 foram necropsiados após a morte natural e eutanásia *in extremis*,
26 respectivamente. O ovino E3, controle, foi submetido a eutanásia no 100º dia após o início
27 do experimento. Durante a necropsia, foram coletados fragmentos dos órgãos citados
28 anteriormente e do encéfalo, o processamento e análise das amostras ocorreu de forma
29 semelhante ao descrito nos casos da intoxicação espontânea, tanto para os exames
30 histoquímicos quanto nas marcações imuno-histoquímicas.

31

RESULTADOS

Nos nove surtos da intoxicação espontânea por *T. cinerea*, foram necropsiados 16 ovinos (ovinos 1-16). Destes, selecionou-se os animais que apresentaram lesões encefálicas compatíveis com encefalopatia hepática (vacuolização na substância branca e junção entre a substância branca e cinzenta e/ou presença de astrócitos de Alzheimer tipo II na substância cinzenta). Os dados epidemiológicos dos nove surtos podem ser apreciados no Quadro 2.

Em todos os animais, clinicamente, foi observado ascite e dispneia, com evolução clínica de 30 a 90 dias. Na maioria dos animais avaliados, a sintomatologia era progressiva culminando com a morte. Sinais neurológicos foram observados com a doença avançada e, principalmente, próxima ao óbito dos ovinos. Sinais clínicos de embotamento foram observados em seis animais (ovinos 6, 9, 11, 12, 15 e 16), três desses também se mantinham em decúbito esternal (ovinos 9, 11 e 12) e apenas um apresentou vocalização (ovino 11).

Durante a necropsia dos 16 ovinos intoxicados espontaneamente foi constatado que havia líquido livre na cavidade abdominal, amarelado, translúcido e com filamentos de fibrina. Em todos os casos a lesão hepática era semelhante, consistindo em fígado recoberto por fibrina e superfície capsular irregular, com áreas claras deprimidas e padrão lobular evidente na superfície de corte, principalmente visualizadas após fixação em formol. Adicionalmente, nos ovinos 4 e 16, havia discretos desvios vasculares (*shunts*) porto-sistêmicos (Fig.1A), os quais consistiam de numerosos vasos tortuosos de pequeno calibre, originados nos ramos abdominais da veia porta que se anastomosavam na veia cava abdominal.

Nos cortes histológicos do fígado de todos os ovinos, corados com HE e tricrômico de Masson, constatou-se que havia leve a acentuada fibrose na região periacinar e capsular, que adentrava o parênquima e formava pontes, associada, por vezes, à presença de moderada hemorragia (Fig. 1B). Notou-se que, no sistema nervoso dos ovinos 2, 5, 11, 12, 15 e 16 (37,5%), havia leve a acentuada vacuolização na junção entre a substância branca e a cinzenta, e na substância branca, das regiões de pedúnculo cerebelar, colículos, cápsula externa e interna, tálamo e hipocampo. Os vacúolos possuíam formato redondo a ovalado e apareciam isolados ou unidos (Fig.1C). Ainda nos ovinos 2, 12, 15 e 16 haviam astrócitos

1 de Alzheimer tipo II (AAII) na substância cinzenta do córtex, tálamo, hipocampo e
2 colículos. Estas células eram caracterizadas por núcleo grande, angulado e cromatina pouco
3 condensada, dispostos isolados ou agrupados em duplas ou aglomerados de três a quatro,
4 distribuídos de forma aleatória e próximos a corpos de neurônios (Fig.1D).

5 Nas secções de encéfalo coradas pelo método de PAS evidenciou-se integridade da
6 membrana vascular dos capilares encefálicos, mesmo em regiões adjacentes às áreas de
7 vacuolização. Um resumo das principais lesões hepáticas e encefálicas dos ovinos
8 espontaneamente intoxicados por *T. cinerea* estão descritos no Quadro 3.

9 No exame IHQ com o anticorpo anti-GFAP notou-se fraca ou nenhuma marcação dos
10 astrócitos de Alzheimer tipo II, nas amostras de córtex e colículo dos ovinos 2, 6,12 e 16
11 (Fig.2). Com o anticorpo anti-S100 houve imunomarcação em todos os cortes, variando de
12 fraca marcação nos ovinos 2, 12 e 15, a moderada nos ovinos 6, 11, 16. Os demais animais
13 demonstraram marcação idêntica ao animal controle no uso dos dois anticorpos (Fig.3).
14 Observou-se variação na intensidade da lesão hepática e lesão encefálica quando os casos
15 eram comparados entre si, tais dados podem ser apreciados no Quadro 3, não existindo
16 correlação entre o grau de fibrose hepática e o grau de lesão encefálica.

17 Quanto aos animais experimentalmente intoxicados, os resultados dos exames
18 bioquímicos apresentam-se na Fig.4. Houve redução discreta nos níveis séricos de ureia nos
19 ovinos experimentais E1 e E2 e discreta elevação dos níveis de GGT. Além disso, o pico de
20 elevação dos níveis séricos de AST ocorreu nos dias antecedentes à morte dos dois ovinos
21 experimentais. A albumina não demonstrou alterações significativas.

22 Após 28 do início do experimento, o ovino E1 evidenciou clinicamente apatia,
23 embotamento, anorexia e aumento de volume abdominal bilateral. No teste de balotamento
24 constatou-se líquido abdominal, o qual foi drenado por abdominocentese e apresentava-se
25 inodoro, translúcido, discretamente amarelado, com escassos filamentos de fibrina. No
26 rúmen observou-se meteorismo, consistência macia à palpação e atonia. No dia seguinte,
27 apresentou diarreia, com fezes amareladas e sangue. Após 30 dias do início do experimento
28 o animal exibiu ataxia, dificuldade em manter-se em estação e morreu naturalmente no
29 mesmo dia. Na necropsia, realizada imediatamente após o óbito, foram observados dois
30 litros de líquido livre na cavidade abdominal. O fígado estava com a superfície capsular
31 irregular, com áreas deprimidas, esbranquiçadas, multifocais a coalescentes, entremeadas

1 por áreas avermelhadas, além de marcada evidenciação do padrão lobular. Ao corte este
2 padrão era visualizado se estendendo ao parênquima do órgão. Havia formação de
3 moderados *shunts* porto-sistêmicos, entre os vasos mesentéricos, veia porta e veia cava
4 abdominal, além de marcado edema no mesentério, abomaso e vesícula biliar.

5 O ovino E2 apresentou hiporexia a partir do 54º dia da ingestão da planta. No 67º dia
6 notou-se distensão bilateral abdominal, caracterizada como ascite através do teste de
7 balotamento. Durante o 78º dia após início do experimento procedeu-se a coleta e análise
8 do líquido que evidenciou as mesmas características visualizadas no líquido coletado do
9 ovino E1. Oitenta e cinco dias após o início do experimento, o ovino E2 apresentava-se
10 com um quadro clínico de embotamento e redução dos reflexos de dor e de resposta a
11 ameaça. No dia 89 o animal mantinha a cabeça pressionada contra a parede da baia e um
12 dia após entrou em decúbito, mantendo-se na posição de “auto-auscultação” e em estado
13 comatoso. No dia seguinte, devido suas condições clínicas, foi eutanasiado e realizada a
14 necropsia. Os 20mL de líquido ascítico e o fígado estavam com as mesmas características
15 que as observadas no ovino E1, além disso havia edema no mesentério e na parede do
16 abomaso e dos pré-estômagos.

17 Microscopicamente, as lesões hepáticas e encefálicas nos ovinos E1 e E2 foram
18 semelhantes às observadas nos animais intoxicados espontaneamente, refletindo mesmos
19 resultados obtidos nos testes histoquímicos, constatando-se, respectivamente, moderada e
20 acentuada fibrose periacinar e capsular com formações de ponte, melhor evidenciada no
21 tricômico de Masson, vacuolização na substância branca e junção entre a substância branca
22 e cinzenta além dos AAI nos cortes de encéfalo corados com HE, e integridade vascular no
23 encéfalo com o PAS, e imuno-histoquímicos, revelando, portanto, fraca ou ausência de
24 marcação nos astrócitos com o anticorpo anti-GFAP e marcação no citoplasma astrocitário
25 com o anticorpo anti-S100.

26

DISCUSSÃO

27 O diagnóstico da intoxicação espontânea por *T. cinerea* em ovinos baseou-se nos achados
28 clínicos de ascite e dispneia, associada a presença da planta no local e as lesões hepáticas
29 macroscópicas e microscópicas, de fibrose periacinar e capsular com formação de pontes,
30 assim como descrito por Riet-Correa et al. (2013). Enquanto que o diagnóstico da
31 encefalopatia hepática foi fundamentado com os sinais clínicos e achados microscópicos no

1 encéfalo (Summers et al. 1994, Wouters et al. 2013).

2 Todos os ovinos intoxicados de forma espontânea e experimental que apresentaram
3 lesão no sistema nervoso desenvolveram, clinicamente, sinais de embotamento; alguns
4 animais, com lesões neurológicas mais extensas, demonstraram sinais clínicos mais
5 acentuados, como decúbito esternal, ataxia e vocalização, e na maioria dos casos havia
6 evolução para a morte do animal. Estes sinais nervosos eram observados principalmente ao
7 final da doença, sendo provável que em alguns casos de intoxicação espontânea e nos casos
8 experimentais anteriormente relatados (Santos et al. 2007, Riet-Correa et al. 2013), os
9 animais tenham sido eutanasiados antes de desenvolverem a encefalopatia hepática.

10 Nos animais experimentais observou-se que o quadro neurológico, caracterizado por
11 embotamento seguido de ataxia, dificuldade de manter-se em estação e pressão da cabeça
12 contra objetos, é semelhante à ao observado na intoxicação por *Senecio brasiliensis* em
13 ovinos (Ilha et al. 2001) e bovinos (Wouters et al.2013). Entretanto, quando se compara a
14 intensidade dessa sintomatologia clínica com casos experimentais de infusão intravenosa de
15 amônia em ovinos, nota-se que nestes últimos os sinais clínicos são mais acentuados e
16 diversificados, com presença de convulsão e pítialismo (Hooper & Finnie 1987).

17 A redução da concentração da ureia sérica, observada nos exames bioquímicos dos
18 ovinos experimentais E1 e E2, pode ter ocorrido pela não metabolização da amônia ou pela
19 diminuição da ingestão de alimentos; enquanto que o aumento da AST ao final do
20 experimento pode ser associado à lesão hepática sofrida por ambos ovinos experimentais e,
21 ainda, este aumento ter sido agravado no ovino E2 pelos distúrbios musculares
22 desenvolvidos em decorrência do decúbito (Tennant & Center 2008). A acentuada fibrose
23 periacinar pode danificar a estrutura periportal do fígado, resultando na elevação dos níveis
24 de GGT visualizada nos ovinos E1 e E2 (Tennant & Center 2008). A ausência de alterações
25 significantes da albumina sérica confirma a afirmação realizada por Riet-Correa et al.
26 (2013) de que a ascite nos casos de intoxicação por *T. cinerea* é decorrente do aumento da
27 pressão hidrostática, devido à fibrose periacinar e capsular do fígado e não por redução da
28 pressão oncótica.

29 A presença de lesão nos hepatócitos da região centrolobular observada nos casos
30 espontâneos e experimentais contribuem para o aumento dos níveis séricos de amônia, pois,
31 estas células são mais eficazes na conversão deste composto nitrogenado (Häussinger

1 1983). Além disso, os *shunts* porto-sistêmicos descritos nos laudos necroscópicos de dois
2 ovinos intoxicados espontaneamente e observados nos ovinos experimentais, secundários à
3 fibrose hepática, previamente descritos nos casos de intoxicação crônica em ovinos por *T.*
4 *cinerea* (Riet-Correa et al. 2013), facilitam a ocorrência da hiperamonemia. A descrição
5 dos *shunts* no laudo necroscópico dos ovinos 4 e 16 e sua visualização nos animais
6 experimentais sugere esta patogenia. Porém, ressalta-se que há possibilidade de que nos
7 demais ovinos intoxicados espontaneamente houvesse *shunts* porto-sistêmicos, no entanto,
8 não foi observado registro nos laudos de necropsia.

9 Histologicamente, a lesão encefálica mais frequentemente visualizada neste trabalho, em
10 animais intoxicados espontaneamente e experimentalmente foi a presença de vacúolos na
11 substância branca e junção entre a substância branca e a cinzenta de diversas regiões do
12 encéfalo, sendo mais proeminente nos pedúnculos cerebelares, colículos, tálamo e cápsula
13 interna e externa, semelhante ao visualizado em bezerros com hiperamonemia induzida
14 experimentalmente (Cho & Leipold 1977), em bovinos na intoxicação por *Senecio* spp.
15 (Wouters et al. 2013) e em diversas espécies com encefalopatia hepática (Stalker & Hayes
16 2007).

17 A hiperamonemia no encéfalo tem inicialmente um efeito citotóxico nos astrócitos, e
18 estas células, em resposta, liberam grande quantidade de glutamina, a qual provoca estresse
19 oxidativo, anormalidades na ação das mitocôndrias e distúrbios na osmolaridade celular,
20 caracterizados histologicamente por astrócitos grandes, vacuolizados e por vezes em grupos
21 de duas ou mais células, denominados de astrócitos de Alzheimer tipo II, visualizados
22 predominantemente em equinos com encefalopatia hepática secundária à intoxicação por
23 *Crotalaria retusa* (Summers et al. 1994, Nobre et al. 2004).

24 Sugere-se que a alteração encefálica ocorra inicialmente nos astrócitos e,
25 posteriormente, um distúrbio osmótico dos oligodendrócitos, permita o influxo de líquido
26 entre as lamelas de mielina, sendo visualizadas histologicamente como vacúolos na
27 substância branca e junção entre a substância branca e cinzenta em regiões específicas do
28 encéfalo (Summers et al. 1997, Ilha et al. 2001). Os achados similares entre os ovinos
29 intoxicados e o animal controle na coloração de PAS confirmam que não há alterações
30 vasculares na patogenia da encefalopatia hepática na intoxicação crônica por *T. cinerea*,
31 semelhante ao descrito na encefalopatia hepática em bovinos na intoxicação por *Senecio* sp.

1 descrito por Wouters et al. (2013).

2 A amônia é capaz de provocar duas respostas astrocitárias, a primeira, trata-se de uma
3 reatividade celular, com proliferação mitocondrial e de retículo endoplasmático liso, a qual
4 pode ser visualizada em seis ovinos intoxicados de forma espontânea e nos dois ovinos
5 experimentais, através da marcação positiva com o anticorpo anti-S-100 (Donato et al.
6 2013). A segunda resposta, observada em quatro ovinos intoxicados espontaneamente e em
7 ambos ovinos experimentais, trata-se de um distúrbio degenerativo, em que os astrócitos
8 acumulam corpos densos e reduzem o volume de GFAP, fazendo com que haja pouca
9 imunoreatividade ao anticorpo anti-GFAP no citoplasma dos astrócitos, corroborando com
10 os resultados descritos na encefalopatia hepática em equinos intoxicados por *T. micrantha*
11 (Bandarra et al. 2011), bovinos intoxicados por *Senecio* sp. (Wouters et al. 2013) e também
12 visualizados por Summers et al. (1994) ao testar o efeito da amônia nos astrócitos em
13 cultura.

14

15

CONCLUSÕES

16 Conclui-se que a *T. cinerea* pode provocar encefalopatia hepática em ovinos intoxicados,
17 caracterizada histologicamente com vacuolização de substância branca e presença de
18 astrócitos de Alzheimer tipo II, predominantemente nas regiões de núcleos da base,
19 colículos, tálamo e córtex. A análise do encéfalo pelo método histoquímico de PAS não
20 demonstra alterações, conferindo ausência de lesão vascular na patogenia da encefalopatia
21 hepática. A fraca marcação no citoplasma dos astrócitos pela técnica de imuno-
22 histoquímica, com emprego do anticorpo anti-GFAP reflete numa degeneração celular e a
23 forte marcação pelo anticorpo anti-S100 sugere reatividade destas células, caracterizando
24 que a patogenia da encefalopatia hepática em ovinos intoxicados pela *T. cinerea* ocorre em
25 decorrência de hiperamonemia com disfunção astrocitária.

26

27 **Agradecimentos:** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
28 (CAPES) pela bolsa do primeiro autor. Trabalho financiado pelo Instituto Nacional de
29 Ciência e Tecnologia para o Controle das Intoxicações por Plantas, Processo CNPq
30 573534/2008-0.

31

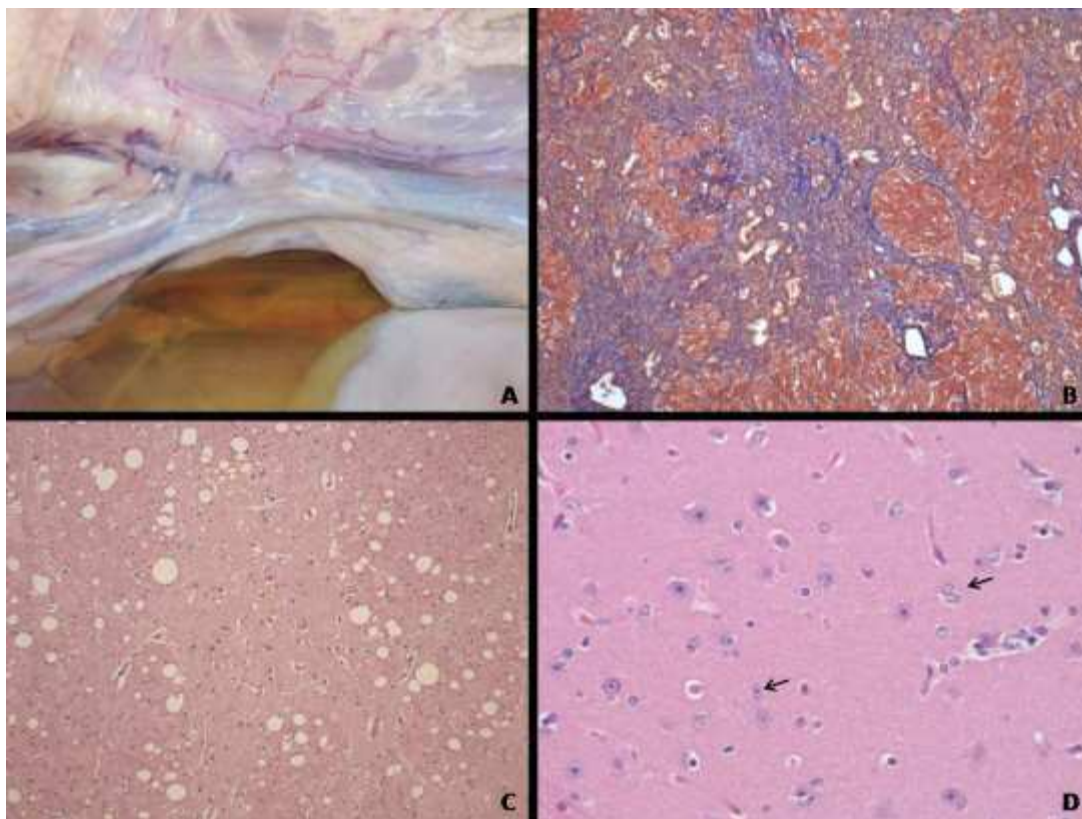
REFERÊNCIAS

- 1
- 2 Bandarra P.M., Bezerra Júnior P.S., Oliveira L.G.S., Correa F.L.F., Borba M.R., Reck
- 3 Júnior J., Cruz C.E.F & Driemeier D. 2011. Intoxicação experimental por *Trema*
- 4 *micranta* (Cannabaceae) em equinos. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11):991-996.
- 5 Cho D.Y. & Leipold H.W. 1977. Experimental spongy degeneration in calves. *Acta*
- 6 *Neuropath.* 39:115-127.
- 7 Donato R., Cannon B.R., Sorci G., Riuzzi F., Hsu K., Weber D.J. & Geczy C.L. 2013.
- 8 Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 13(1):24-57.
- 9 Häussinger D. 1983. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and
- 10 the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur.*
- 11 *J. Biochem.* 133: 269-275.
- 12 Hooper P. T & Finnie J. W. 1987. Focal spongy changes in the central nervous system of
- 13 sheep and cattle. *J. Comp. Path.* 97:433-440.
- 14 Ilha M.R.S., Loretto A.P., Barros S.S. & Barros C.S.L. 2001. Intoxicação espontânea por
- 15 *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*
- 16 21(3):123-138.
- 17 Kinde H., Pasavento P.A., Loretto A.P., Adaska J.M., Barr B.C., Moore J.D., Anderson
- 18 M.L., Rimoldi G., Hill A.E. & Jones M.E.B. 2014. Congenital portosystemic shunts and
- 19 hepatic encephalopathy in goat kids in California: 11 cases (1999-2012). *J. Vet. Diagn.*
- 20 *Invest.* 26(1):173-177.
- 21 Nobre V.M.T., Riet-Correa F., Barbosa Filho J.M., Dantas A.F.M., Tabos I.M. &
- 22 Vasconcelos J.S. 2004. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüídeos no
- 23 semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 24(3):132-143.
- 24 Riet-Correa F., Carvalho K.S., Riet-Correa G., Barros S.S., Simões S.V.D., Soares M.P. &
- 25 Medeiros R.M.T. 2013. Periacinar liver fibrosis caused by *Tephrosia cinerea* in sheep.
- 26 *Res. Vet. Sci.* 95:200-203.
- 27 Rissi D.R., Pierezan F., Oliveira-Filho J.C., Lucena R.B., Carmo P.M.S. & Barros C.S.L.
- 28 2010. Abordagem Diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes
- 29 e equinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):358-367.
- 30 Santos J.C.A., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Barros S.S., Molyneux R.J., Medeiros
- 31 R.M.T., Silva D.M. & Oliveira O.F. 2007. Toxic hepatopathy in sheep associated with

- 1 the ingestion of the legume *Tephrosia cinerea*. J. Vet. Diagn. Invest. 19:690-694.
- 2 Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system, p.330-331. In: Jubb, K.V.F.;
- 3 Kennedy, P.C. & Palmer, N. (Ed) Pathology of domestic animals. Vol 2. 5nd ed.
- 4 Elsevier, Philadelphia.
- 5 Summers B.A., Cummings J.F. & De Lahunta A. 1994. Degenerative diseases of the
- 6 central nervous system, p. 208-211. In: Ibid. (Eds), Veterinary Neuropathology. Mosby,
- 7 St Louis.
- 8 Tennant B.C. & Center S.A. 2008. Hepatic function, p. 379-412. In: Kaneko, J.J.; Harvey,
- 9 J.W. & Bruss, M.L. (Ed) Clinical biochemistry of domestic animals. Elsevier, San
- 10 Diego.
- 11 Traverso S.D., Colodel E.M., Loretto A.P.; Correia A.M. & Driemeier D. 2003. Intoxicação
- 12 natural por *Trema micrantha* em caprinos. Cienc. Rural 33(1):133-136.
- 13 Wouters A.T.B., Boabaid F.M., Fredo G., Wouters F. & Driemeier D. 2013. Caracterização
- 14 imuno-histoquímica das alterações encefálicas em bovinos com hepatopatia tóxica por
- 15 *Senecio* sp. Pesq. Vet. Bras. 33(11): 1325-1331.
- 16

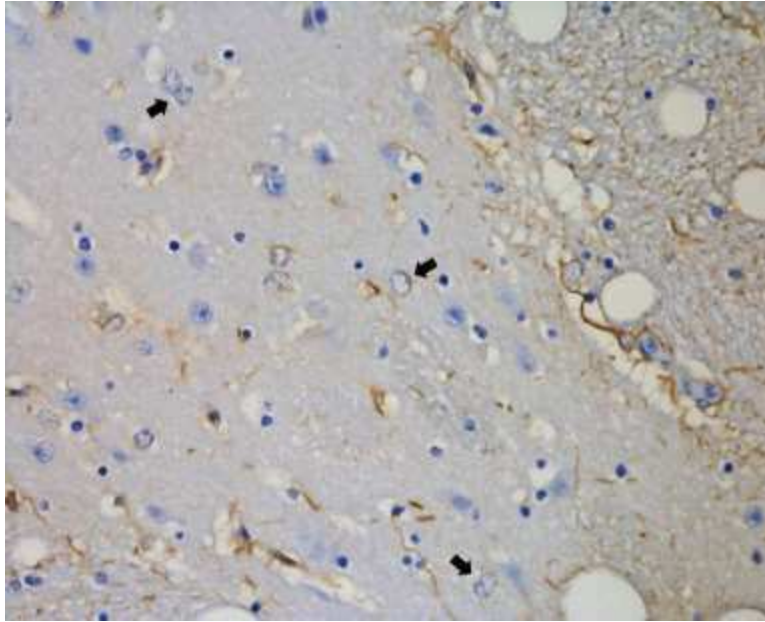
1

2

Legendas das Figuras

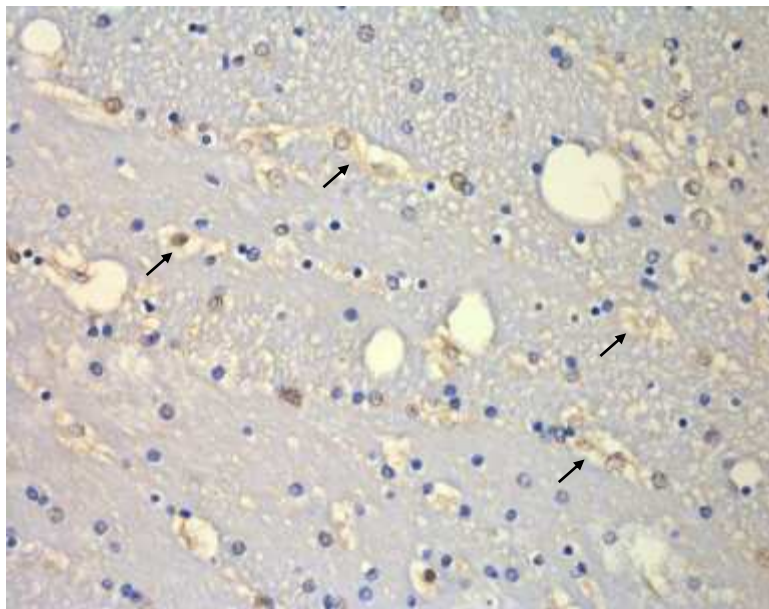
3

4 Fig 1: Intoxicação natural por *Tephrosia cinerea* em ovinos. A) Cavidade abdominal
5 evidenciando ascite e discretos *shunts* porto-sistêmicos (ovino 16). B) Acentuada fibrose
6 periacinar, com formação de pontes (ovino 2). Tricômico de Masson, Obj 4. C) Junção
7 entre substância branca e cinzenta de córtex com marcada vacuolização nas junções entre
8 as substâncias (ovino 12). Hematoxilina e eosina, Obj 20. D) Substância cinzenta de córtex
9 evidenciando astrócitos de Alzheimer tipo II (seta) (ovino 2). Hematoxilina e eosina, Obj
10 40.



1

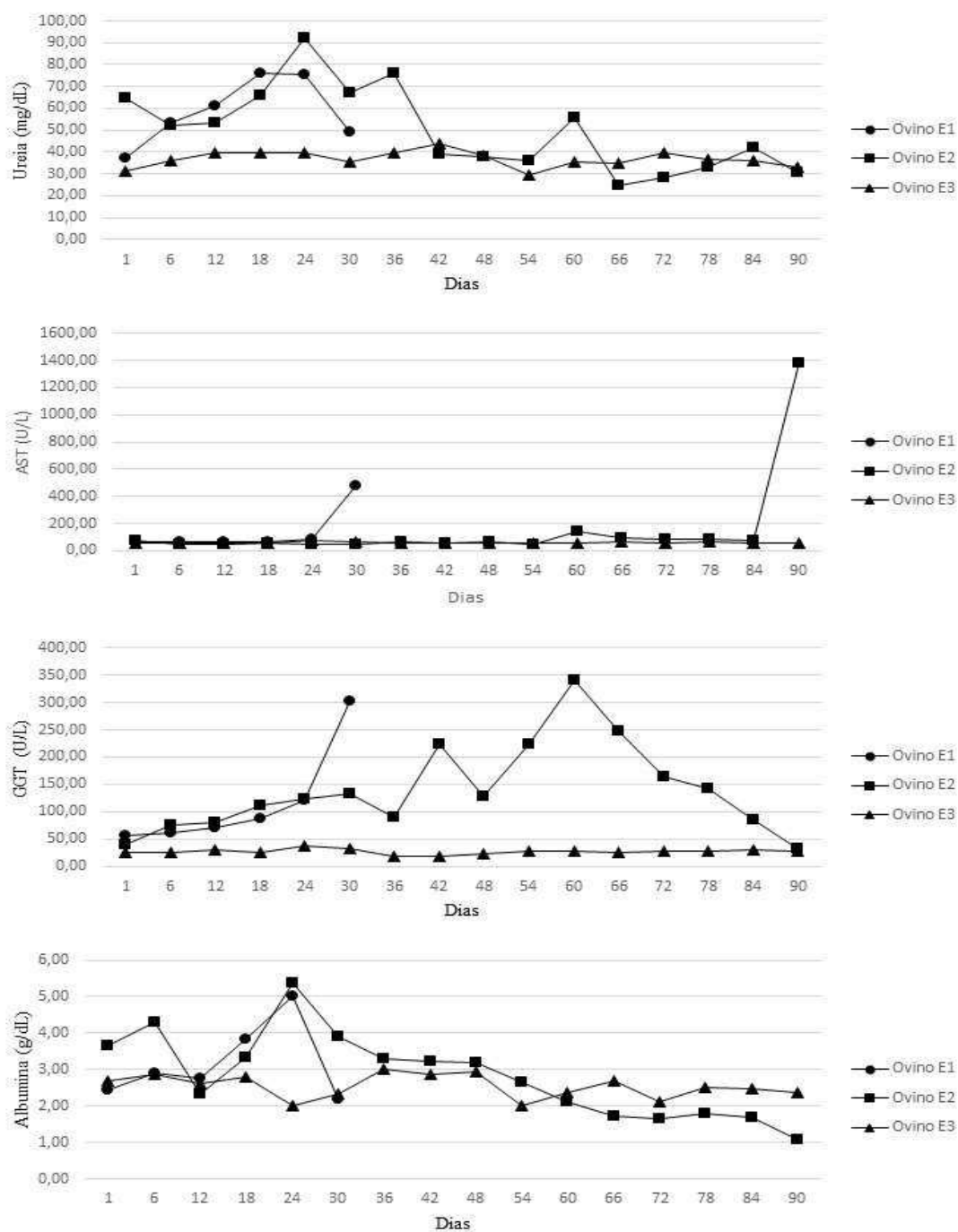
2 Fig 2: Junção entre substância branca e cinzenta de córtex de ovino intoxicado
 3 espontaneamente por *Tephrosia cinerea*. Realçados pelas setas, observa-se astrócitos de
 4 Alzheimer tipo II com fraca ou ausência de marcação citoplasmática (seta) (ovino 6).
 5 Imunomarcção anti-GFAP, método estreptavidina-biotina-peroxidase. Cromógeno DAB,
 6 Obj. 40.



7

8 Fig 3: Junção entre substância branca e cinzenta de córtex de ovino intoxicado
 9 espontaneamente por *Tephrosia cinerea*. Imunomarcção anti-S100 em astrócitos (seta)
 10 (ovino 12), método estreptavidina-biotina-peroxidase. Cromógeno DAB, Obj. 40.

11



1

2 Fig 4: Níveis de ureia, AST, GGT e albumina do grupo experimental de ovinos E1 e E2
 3 intoxicados experimentalmente por *T. cinerea* e ovino controle E3. Os valores de referência normal
 4 para ureia são 17,12-42,8 mg/dL, para AST 60-280 U/L, para GGT 20-52 U/L e para albumina 2,4-3
 5 g/dL.

6

1

Quadro 1: Origem dos anticorpos primários, diluições, recuperações antigênicas e cromógeno utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo primário ^a	Especificações do anticorpo	Diluição do anticorpo	Recuperação antigênica ^b	Cromógeno
Anti-GFAP (Ref. Z0334)	Policlonal coelho	1:500	TRIS-EDTA ^c pH 9.0, 96°C, 10min	DAB ^d
Anti-S100 (Ref. Z0311)	Policlonal coelho	1:200	Tampão citrato pH 6.0, 96°C, 20min	DAB

^a Dako; ^b Obtida em panela de pressão; ^c TRIS ^d diaminobenzidina 3,3'.

2

Quadro 2: Dados epidemiológicos dos ovinos intoxicados espontaneamente pela *T. cinerea*

Surto	Local	Data	Total de Animais	Nº Doentes	Nº Mortos ^a	Nº animais necropsiados	Tipo de Óbito	Idade	Raça	Sexo
1	São José do Bonfim, PB	Nov a Dez 2003	35	10	8	1	Natural	8 meses	Santa Inês	F ^b
						2	Natural	3 anos	SRD ^b	F
						3	Natural	Adulta	Santa Inês	F
						4	Natural	Adulta	Santa Inês	F
2	Caicó, RN	Nov 2004	10	1	1	5	Eutanásia	1 ano	SRD	M ^b
3	Serra Negra, RN	Ago 2007	150	30	23	6	Natural	6 meses	SRD	F
						7	Eutanásia	6 meses	SRD	F
4	Patos, PB	Out 2008	60	30	1	8	Natural	6 meses	Dorper	F
5	Catingueira, PB	Set 2010	80	NI ^b	NI	9	Natural	NI	SRD	F
						10	Natural	8 meses	SRD	F
6	São José do Bonfim, PB	Mai a Nov 2012	50	20	20	11	Natural	Jovem	SRD	F
						12	Eutanásia	Adulto	SRD	F
						13	Natural	Adulto	SRD	M
7	Patos, PB	Set 2012	35	3	2	14	Natural	6 anos	Dorper	F
8	Catingueira, PB	Out 2012	40	NI	NI	15	Natural	3 anos	Dorper	M
9	Patos, PB	Set 2015	25	3	0	16	Eutanásia	1 ano	Santa Inês	F

^aNúmero de mortes que ocorreram antes ou durante as visitas, não foi informado se os animais que permaneceram doentes morreram posteriormente. ^bNI: não informado; SRD: sem raça definida; M: macho; F: fêmea

Quadro 3: Grau da fibrose no fígado e presença de astrócitos de Alzheimer tipo II e vacuolização no encéfalo de ovinos intoxicados espontaneamente pela *T. cinerea*.

Surto	Nº animal	Fibrose hepática	Lesão Encefálica	
			AAII ^a	Vacuolização
	1	++	-	-
1	2	+++	+++ HC, NB, CT	+TA
	3	+	-	-
	4	+++	-	-
2	5	+	-	-
3	6	+	++NB, PC	++ NB, TA, PC, CO
	7	+	-	-
4	8	+++	-	-
	9	+++	-	-
5	10	+	-	-
	11	+	-	+++ CT, TA, NB, PC, CB, CO
6	12	+	++CT, +++ NB	+++ CT, TA, NB, PC
	13	++	-	-
7	14	++	-	-
8	15	+++	++CO	++ TA, CO
9	16	++	++CO	++CO, +PC

^aAstrócitos Alzheimer tipo II; - ausente; + pouca quantidade; ++ moderada quantidade; +++ grande quantidade. CB: cerebelo; CT: córtex; CO: colículos; HC: hipocampo; NB: núcleos da base; PC: pedúnculo cerebelar; TA: tálamo.

CAPÍTULO II

Caracterização epidemiológica, clínico-patológica e histoquímica da tuberculose no sistema nervoso central de bovinos no semiárido da Paraíba

Trabalho a ser submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira

1 **Caracterização epidemiológica, clínico-patológica e histoquímica da tuberculose no**
 2 **sistema nervoso central de bovinos no semiárido da Paraíba¹**

3 Aline Monteiro Silveira^{2*}, Eduardo de Melo Nascimento², Guilherme Konrad³, Eldinê
 4 Gomes de Miranda Neto², David Driemeier³, Glauco José Nogueira de Galiza², Antonio
 5 F.M. Dantas², & Franklin Riet-Correa^{2,4}

6 **ABSTRACT:** Silveira A.M., Nascimento E.M., Konrad G., Miranda Neto E.G., Simões
 7 S.V.D., Driemeier D., Galiza G.J.N., Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2016.
 8 **[Epidemiological, clinical-pathological and histochemical characterization of**
 9 **tuberculosis in central nervous system in cattle in the semiarid region of Paraíba]**
 10 Caracterização epidemiológica, clínico-patológica e histoquímica da tuberculose no sistema
 11 nervoso central de bovinos no semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*
 12 *00(0):00-00*. Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Universidade Federal
 13 de Campina Grande, Avenida Universitária, S/N, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970,
 14 Brasil. E-mail: silveira.a.monteiro@gmail.com.

15
 16 Describes the epidemiology, clinical pathological findings and histochemical from
 17 tuberculosis in the central nervous system (CNS) of cattle diagnosed in Animal Pathology
 18 Laboratory of the Federal University of Campina Grande (LPA-UFCG). We reviewed the
 19 autopsy reports of 851 bovine necropsies performed on 2003 period to 2016, of these, 73
 20 cattle were diagnosed with tuberculosis and six showed lesions in the CNS. All six
 21 diagnoses were made based on macroscopic and histopathologic lesions, and confirmed by
 22 histochemistry and immunohistochemistry. There was no predilection for sex or age,
 23 affecting young and adult cattle. Three cattle presented exclusively nerve signals, two had
 24 respiratory signs and weight loss and one did not present any clinical signs.
 25 Macroscopically, in five cattle had thickening of the leptomeninges, mainly, in the region

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

²Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58708-110, Brasil. *Autor para correspondência: silveira.a.monteiro@gmail.com.

³Setor de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS, 90540-000, Brasil.

⁴Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia, Uruguay. franklin.riet@pq.cnpq.br, frcorrea@inia.org.uy.

1 near the brain basilar Willis cycle, in addition to the meninges of the cerebellum, spinal
2 cord and cortex. In just an animal, there was the single tuber formation in cerebellar region.
3 Microscopically we observed moderate to severe granulomatous meningitis in five cattle.
4 The regions most affected were colliculus, cerebellum, bridge, obex, cortex, and spinal
5 cord. Five cattle presented lung lesions and mediastinal lymph nodes and three of them had
6 disseminated lesions in other organs. In all cattle were found amid the lesions in the CNS
7 acid-fast bacilli and had positive marking in technique of immunohistochemistry with
8 polyclonal antibody anti-*Mycobacterium tuberculosis*. It is concluded that bovine
9 tuberculosis in central nervous system occurs sporadic in Paraíba, in cattle fundamentally
10 adults, with disseminated lesions in other organs. Probably spread through transmission
11 agent, with favoritism of Willis in the installation of the lesions in the CNS.

12

13 INDEX TERMS: *Mycobacterium* sp., acid-fast resistant bacteria, Ziehl Neelsen,
14 neuropathology.

15

16 **RESUMO:** Descreve-se a epidemiologia, os achados clínico-patológicos e histoquímicos
17 da tuberculose no sistema nervoso central (SNC) de bovinos, diagnosticados no Laboratório
18 de Patologia Animal, da Universidade Federal de Campina Grande (LPA-UFCG). Foram
19 revisados os laudos de necropsia de um total de 851 necropsias de bovinos realizadas no
20 período de 2003 a 2016, destes, 73 bovinos foram diagnosticados com tuberculose e seis
21 apresentavam lesões no SNC. Todos os seis diagnósticos foram realizados com base nas
22 lesões macroscópicas e histopatológicas e confirmadas pela histoquímica e imuno-
23 histoquímica. Não houve predileção por sexo ou idade, acometendo bovinos jovens e
24 adultos. Três bovinos apresentaram exclusivamente sinais nervosos, dois tinham sinais
25 respiratórios e perda de peso e um não apresentava nenhum sinal clínico.
26 Macroscopicamente, em cinco bovinos havia espessamento das leptomeninges,
27 principalmente, da região basilar encefálica próxima ao ciclo de Willis, além das meninges
28 do cerebelo, medula espinhal e córtex. Em apenas um bovino houve a formação de
29 tubérculo único na região cerebelar. Microscopicamente observou-se moderada a acentuada
30 meningite granulomatosa em cinco bovinos. As regiões mais acometidas foram colículos,
31 cerebelo, ponte, óbex, córtex, e medula espinhal. Cinco bovinos apresentaram lesões

1 pulmonares e dos gânglios mediastínicos e três deles tinham lesões disseminadas em outros
2 órgãos. Em todos os bovinos foram encontrados em meio as lesões no SNC bacilos ácido-
3 álcool resistentes e tiveram marcação positiva na técnica de imuno-histoquímica com
4 anticorpo policlonal anti-*Mycobacterium tuberculosis*. Conclui-se que a tuberculose do
5 sistema nervoso central de bovinos ocorre de forma esporádica na Paraíba, em bovinos
6 fundamentalmente adultos, com lesões disseminadas em outros órgãos. Sendo que
7 provavelmente há disseminação do agente através da via hematogena, com favorecimento
8 do ciclo de Willis na instalação das lesões no SNC.

9

10 TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Mycobacterium* sp., bactérias ácido-álcool resistentes, Ziehl
11 Neelsen, neuropatologia.

12

INTRODUÇÃO

13 A tuberculose é uma doença importante para a pecuária brasileira e a saúde pública. Causa
14 perdas econômicas por baixa na produção de leite e de carne e abate dos animais positivos
15 ao teste alérgico intradérmico, implantado pelo Programa Nacional de Controle e
16 Erradicação da Tuberculose e da Brucelose (PNCETB). Além disso, o contato direto dos
17 trabalhadores com os bovinos e alimentos infectados, implica na possibilidade de infecção
18 dos seres humanos por *Mycobacterium* spp. (Roxo 1997, Riet-Correa & Garcia 2007).

19 Comumente, os bovinos acometidos pela doença apresentam emagrecimento
20 progressivo, e em alguns casos, tosse improdutiva, estes sinais estão associados à via de
21 transmissão aerógena (Sanches et al. 2000, Ribas et al. 2013, Andrezza et al. 2015).
22 Esporadicamente, especialmente em bovinos jovens, observa-se manifestação clínica
23 neurológica e lesões granulomatosas nas leptomeninges do encéfalo e medula espinhal
24 (Sanches et al. 2000, Oruç 2005, Riet-Correa & Garcia 2007; Del Fava et al, 2010; Ribas et
25 al. 2013). Os sinais clínicos nestes casos são relacionados com a via de transmissão
26 transplacentária ou infecção do agente através da ingestão de leite contaminado, sendo a
27 posterior disseminação pela via hematogena, que possibilita a ascendência ao sistema
28 nervoso central (SNC) (Roxo 1997, Oruç 2005, Riet-Correa & Garcia 2007, Del Fava et al.
29 2010, Borges et al. 2013, Domingo et al. 2014).

30 No Brasil, há poucos estudos que relatam à infecção por *Mycobacterium* spp. afetando o
31 SNC de bovinos, em sua maioria, os relatos descrevem a infecção em casos esporádicos ou

1 isolados (Sanches et al. 2000, Galiza et al. 2010, Konradt et al. 2016), exaltando-se a
2 importância deste trabalho, o qual visa a descrição dos achados epidemiológicos, clínico-
3 patológicos e histoquímicos da tuberculose no SNC de bovinos, diagnosticados na área de
4 abrangência do Laboratório de Patologia Animal, da Universidade Federal de Campina
5 Grande (LPA-UFCG), na Paraíba.

6 MATERIAL E MÉTODOS

7 Casos de tuberculose com envolvimento do SNC foram pesquisados dentre os laudos de
8 necropsias de bovinos provenientes dos arquivos do LPA-UFCG, num período de 14 anos
9 (2003-2016). Desses laudos, foram retiradas informações referentes a raça, o sexo e a
10 idade, os sinais clínicos, realização do teste de tuberculinização e as alterações
11 macroscópicas e histológicas previamente descritas. Os espécimes de SNC e outros órgãos
12 provenientes das necropsias haviam sido fixados em formol a 10% e processados
13 rotineiramente para histopatologia. Seções de 3-5µm, coradas pela técnica de Hematoxilina
14 e Eosina (HE), foram avaliadas visando principalmente caracterizar a resposta inflamatória
15 em cada caso. Em cortes do SNC foram realizadas, também, técnicas histoquímicas como
16 Ziehl-Neelsen, Tricrômico de Masson e Von Kossa para a visualização do agente e
17 evidênciação do tecido conjuntivo fibroso e mineralização, respectivamente. Secções do
18 SNC foram selecionadas para o exame de imuno-histoquímica, na qual se utilizou anticorpo
19 policlonal anti-*Mycobacterium tuberculosis* na diluição de 1:200 em PBS (phosphate-
20 buffered saline). Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se peróxido de
21 hidrogênio a 10% por 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com protease
22 XIV por 15 minutos em temperatura ambiente. O bloqueio das reações inespecíficas foi
23 realizado com solução de caseína (leite em pó desnatado) a 5% por 15 minutos em
24 temperatura ambiente. O anticorpo primário foi incubado por 45 minutos a 37°C. O
25 anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase
26 (LSAB+System-HRP) foram utilizados consecutivamente, incubados à temperatura
27 ambiente por 20 minutos cada. AEC³ (3-Amino-9-ethylcarbazole) foi o cromógeno
28 utilizado e após este processo as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris
29 por um minuto, desidratadas e montadas com meio aquoso e lamínula. Para o controle
30 positivo utilizou-se fragmento de pulmão de um bovino com diagnóstico positivo para
31 *Mycobacterium tuberculosis* na técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Como

1 controles negativos foram utilizados às mesmas seções a serem testadas, com a substituição
2 do anticorpo primário por diluente de anticorpo.

3 **RESULTADOS**

4 De um total de 851 necropsias de bovinos realizadas no LPA-UFCG no período de 2003 a
5 2016, 73 (8,58%) tiveram diagnóstico positivo para tuberculose, e em seis (8,2% dos casos
6 de tuberculose) destes casos havia envolvimento do SNC.

7 Todos os seis bovinos com lesão no SNC eram mantidos em regime de criação semi-
8 extensivo, com exploração leiteira. Os dados epidemiológicos, os sinais clínicos dos seis
9 bovinos e o teste de tuberculinização realizado em dois animais encontram-se descritos no
10 Quadro 1. Os bovinos 1 e 6 apresentaram sinais clínicos caracterizados por distúrbios
11 respiratórios, como dispneia, tosse e cansaço, sem sinais neurológicos evidentes. E apenas
12 estes dois casos foram necropsiados com a suspeita prévia de tuberculose, nos demais casos
13 o diagnóstico presuntivo de tuberculose não foi considerado, e ainda os bovinos 4 e 5
14 tinham a suspeita clínica de raiva. O caso 3 não apresentava sinais clínicos e foi realizada
15 eutanásia pela positividade no teste de brucelose. No bovino 2 foi realizada a análise do
16 líquido cefalorraquidiano verificando-se acentuada linfocitose.

17 A tuberculinização foi realizada no bovino 1, que reagiu positivamente ao teste, e no
18 bovino 2 que foi negativo. Nos demais animais não foi realizado teste de tuberculinização.
19 Os bovinos 1 e 2 tiveram morte natural devido o agravamento do quadro clínico. Os
20 bovinos 4 e 5 foram eutanasiados devido a gravidade dos sinais clínicos neurológicos e
21 prognóstico desfavorável. Apesar de não ter sido realizado a tubeculinização do bovino 3 e
22 não apresentar sintomatologia clínica, o mesmo foi eutanasiado por ser positivo no teste de
23 brucelose.

24 Macroscopicamente, observou-se que as leptomeninges da região ventral do tronco
25 encefálico dos bovinos 1, 2, 3 e 5 estavam acinzentadas e moderadamente espessadas (Fig.
26 1A) por múltiplos nódulos de 0,2-1 mm de diâmetro, amarelados e irregulares com
27 consistência variando entre macia a firme. O espessamento das meninges envolvia os
28 colículos e estendia-se até as leptomeninges da medula espinhal sacral nos bovinos 2 e 5
29 (Fig. 1B), e afetava as leptomeninges do córtex frontal, foice cerebelar e cerebelo no
30 bovino 3. Havia discreta herniação cerebelar no bovino 4 associada a massa amarelo
31 esbranquiçada, rugosa, macia, medindo aproximadamente 3 cm de diâmetro na região de

1 quarto ventrículo (Fig. 1C). No bovino 6 observou-se pequena área de espessamento e
2 pequenos nódulos amarelados de aproximadamente 1 mm de diâmetro próxima ao
3 espessamento na meninge do córtex frontal.

4 Ao corte seriado do encéfalo do bovino 2 evidenciaram-se projeções no interior dos
5 ventrículos laterais, que rangiam ao corte (Fig. 1D). Na porção ventral da medula espinal
6 observavam-se ainda áreas irregulares, esbranquiçadas, de até 5 mm de diâmetro, que
7 afetavam a substância branca e a cinzenta. No bovino 3 observavam-se múltiplos nódulos
8 amarelados, de superfície lisa, medindo em média 2 mm de diâmetro na região ventral do
9 verme cerebelar, além da dilatação dos ventrículos laterais. O bovino 4, além da massa no
10 quarto ventrículo, apresentou dilatação do aqueduto mesencefálico, terceiro ventrículo e
11 ventrículos laterais. A substância cinzenta adjacente ao espessamento da meninge do córtex
12 do bovino 6 apresentava-se com consistência amolecida e com aspecto grumoso,
13 semelhante à malácia.

14 Além das lesões no SNC observavam-se nodulações amarelo esbranquiçadas, macias,
15 bem delimitadas, que exibiam resistência ao corte e continham material caseoso com o
16 centro mineralizado, afetando o pulmão de todos os bovinos, exceto o bovino 3. Os
17 linfonodos mediastínicos apresentavam-se aumentados de volume com nodulações
18 semelhantes às visualizadas no pulmão, nos bovinos 1, 2, 5 e 6. Observavam-se também
19 múltiplos nódulos brancacentos nos rins do bovino 1 e 6 e fígado do bovino 4 e 6. O bovino
20 6 apresentou estas mesmas formações no globo ocular esquerdo, nos linfonodos
21 mesentéricos e intramamário, na musculatura diafragmática, no baço, na glândula mamária,
22 nos cornos uterinos e no saco pericárdico, além de exibir nodulações amareladas em meio a
23 abundante quantidade de fibrina entre o saco pericárdico e o epicárdio.

24 Microscopicamente, observou-se espessamento das leptomeninges em todos os bovinos
25 (Fig. 2A), exceto no bovino 4, com graus de intensidade variando de moderado, nos
26 bovinos 1 e 3, a acentuado nos bovinos 2, 5 e 6. As regiões mais acometidas foram córtex
27 (todos os animais), colículo, cerebelo, ponte, óbex (bovinos 1, 2, 3 e 5) e medula espinal
28 (bovinos 2 e 5). Este espessamento era caracterizado por múltiplos granulomas com área
29 central de necrose eosinofílica circundada por infiltrado inflamatório mononuclear
30 composto por linfócitos, macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas do tipo
31 Langerhans associado a discreta proliferação de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 2B). Nos

1 bovinos 2, 3 e 4, observaram-se mineralização da região central de alguns granulomas. A
2 formação granulomatosa era mais acentuada ao redor de vasos, resultando em
3 espessamento das respectivas túnicas íntima, com a presença de até cinco camadas de
4 células fusiformes com citoplasma e núcleo grande e alongado. Em algumas áreas, os vasos
5 observados no centro da inflamação apresentam paredes eosinofílicas com deposição de
6 material homogêneo e hialino, semelhante à necrose fibrinoide.

7 Havia encefalite discreta (bovinos 1, 3, 4 e 6) a moderada (bovinos 2 e 5), caracterizada
8 por vasculite linfocítica no neuropilo adjacente aos granulomas. Além disso, nos bovinos 1,
9 2, 3 e 5 os granulomas das leptomeninges dos córtices, cerebelo e pedúnculo cerebelar,
10 comprimiam o neuropilo adjacente e no bovino 5 era associado à vacuolização e esferóides
11 axonais. Os granulomas das leptomeninges infiltraram o neuropilo cortical do Bovino 6, o
12 qual apresentava extensa área de malácia. Na medula espinhal do bovino 2 foram
13 observados esferóides axonais na substância branca e vacúolos de diferentes tamanhos, por
14 vezes contendo células Gitter (“câmara de digestão”). Neste mesmo animal, havia focos de
15 deposição de material granular, amorfo, fortemente basofílico, compatível com
16 mineralização, na camada granulosa do cerebelo e no neuropilo da região ventral da ponte
17 (Fig. 2C).

18 O bovino 4 apresentava o mesmo padrão de inflamação granulomatosa ao redor de
19 vasos, entretanto, a camada mais externa dos granulomas continha maior quantidade de
20 células gigantes multinucleadas e tecido fibroso entremeando e circundando a inflamação.
21 As células inflamatórias infiltravam o cerebelo e a lateral do pedúnculo cerebelar,
22 provocando destruição do tecido adjacente.

23 Nos outros órgãos (pulmão, fígado, rim, linfonodos, baço, peritônio, útero e glândula
24 mamária) observavam-se áreas multifocais granulomatosas, compostas por linfócitos,
25 macrófagos e células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans, com o centro necrótico,
26 por vezes mineralizados, e revestidas por cápsula fibrosa espessa. No globo ocular os
27 granulomas invadiram a úvea e ocuparam toda a câmara anterior e posterior. Os
28 granulomas no útero detinham-se à mucosa e havia mineralização da camada muscular dos
29 vasos da mucosa e submucosa.

30 Na coloração de Ziehl-Neelsen evidenciou-se discreta (bovinos 2 e 3) a acentuada
31 (bovinos 1, 4, 5 e 6) quantidade de estruturas finas, em forma de bastonetes, coradas em

1 vermelho, localizadas no citoplasma de macrófagos e células gigantes multinucleadas do
2 tipo Langerhans e livres no granuloma (Fig. 2D). Com o Tricrômico de Masson observou-
3 se discreta proliferação de tecido colagenoso, não somente circundando o granuloma, mas
4 também adentrando e entremeando as células inflamatórias, além de evidenciar o
5 espessamento, em até sete vezes, da parede dos vasos presentes no centro e ao redor dos
6 granulomas (Fig. 2E). Na coloração de Von Kossa evidenciou-se mineralização no
7 neuropilo do Bovino 2 e no centro de alguns granulomas das leptomeninges dos bovinos 2,
8 3 e 4 (Fig. 2C).

9 Todos os bovinos tiveram marcação positiva na técnica de imuno-histoquímica com
10 anticorpo policlonal anti-*Mycobacterium tuberculosis*. A imunomarcação era observada,
11 predominantemente, no citoplasma de macrófagos e células gigantes multinucleadas; e
12 raramente livres nas lesões granulomatosas (Fig. 2F). A evidenciação dos bacilos na técnica
13 de imuno-histoquímica variou de acentuada nos bovinos 1, 2 e 4; moderada nos bovinos 3 e
14 6 e discreta no bovino 5.

15 DISCUSSÃO

16 Pelos resultados deste trabalho, constata-se que a tuberculose diagnosticada em 73 de 851
17 necropsias de bovinos, afeta esporadicamente o SNC, sendo diagnosticado em seis dos 73
18 bovinos necropsiados, é capaz de provocar lesões em animais de raça e idade diferentes,
19 com intensidade e extensão variável, que influencia no aparecimento de sinais clínicos, que
20 inclusive pode cursar com distúrbios neurológicos de acordo com a localização da lesão,
21 apresentando sinais primordialmente encefálicos ou associados a distúrbios medulares, ou
22 até mesmo, apenas com as alterações respiratórias e de caquexia ou ainda sem qualquer
23 sinais clínicos, como ocorreu em um dos casos deste estudo (Riet-Correa et al. 2002, Riet-
24 Correa & Garcia 2007, Del Fava et al. 2010). O diagnóstico nos seis casos em que houve a
25 instalação do agente no SNC foi baseado nas alterações macroscópicas e histopatológicas e
26 confirmados pela imuno-histoquímica.

27 O teste de tuberculinização, realizada em dois dos seis casos, possibilitou o diagnóstico
28 prévio de apenas um animal, implicando em eutanásia do mesmo. A reação negativa ao
29 teste de tuberculina pode ocorrer em casos de infecção recente ou muito tardios, assim
30 como pela realização do teste no mesmo animal com intervalos menores que 60 dias; nesses
31 casos são necessários outros exames comprobatórios (Marassi et al. 2013, Tizard 2014).

1 Apesar do resultado negativo observado em um animal, a observação de que quatro bovinos
2 apresentaram exclusivamente sinais nervosos, sugere que a tuberculose deve ser
3 diagnóstico diferencial em bovinos com mais de 6 meses de idade com sinais nervosos.

4 A idade da maioria dos bovinos com tuberculose no SNC deste trabalho foi igual ou
5 superior a 12 meses, diferindo do que é proposto na literatura, que acusa a idade inferior a
6 12 meses para a mais comumente afetada por esta condição (Konradt et al. 2016), havendo
7 ainda associação desta lesão com a via de infecção transplacentária ou através da ingestão
8 de leite de animais com lesões de tuberculose no útero e/ou na glândula mamária,
9 respectivamente (Roxo 1997, Oruç 2005, Barros et al. 2006, Riet-Correa & Garcia 2007,
10 Del Fava et al. 2010, Borges et al. 2013, Domingo et al. 2014).

11 Entretanto, o fato dos casos descritos neste trabalho afetar primordialmente animais
12 adultos, a maioria com lesões pulmonares ou generalizadas, sugere que a infecção do SNC
13 ocorreu por disseminação da lesão pulmonar primária. Após invadir o organismo,
14 *Mycobacterium* spp. infecta macrófagos, que irão circular pela corrente sanguínea do
15 animal e alcançar diversos órgãos, como fígado, linfonodos, rins, baço, útero, glândula
16 mamária, olho e o SNC (Coutinho & Tarragô 1976, Oruç 2005, Del Fava et al. 2010,
17 Domingo et al. 2014, Tizard 2014). No SNC, o agente também é capaz de infectar células
18 da microglia (Rock et al. 2008).

19 Dada a localização das lesões, preferencialmente nas meninges da região basilar do
20 encéfalo e pelas características anatômicas da perfusão sanguínea do SNC, sugere-se que as
21 bactérias ingressam no sistema nervoso pelos vasos do Ciclo de Willis; nesta estrutura há
22 concentração do sangue para a distribuição inicial do sangue arterial encefálico além de
23 haver alteração do fluxo sanguíneo local (Oruç 2005, Barros et al. 2006, Rock et al. 2008,
24 Dyce et al. 2010, Konradt et al. 2016).

25 Não é conhecido o mecanismo que interfere na formação de cada lesão específica na
26 tuberculose no SNC, porém, é sabida a existência de três formas de apresentação bem
27 definidas nos seres humanos: espessamento meningeano, distribuição miliar e formação de
28 tubérculos únicos (Coutinho & Tarragô 1976). Dentre essas lesões da tuberculose, o
29 espessamento das meninges é o mais frequente, visto em cinco dos seis casos estudados
30 neste trabalho. A formação de uma massa única, observada em um só caso (bovino 4),
31 ocorre eventualmente (Konradt et al. 2016).

1 O tecido fibroso que envolvia os granulomas no SNC dos bovinos, evidenciado pela
2 técnica de tricrômico de Masson, por ser escasso, difere da fibrose observada comumente
3 em outros órgãos afetados pelo agente, tanto dos bovinos estudados, quanto na literatura
4 (Andreazza et al. 2015); este padrão de fibrose mantém as células inflamatórias livres e
5 facilita a infiltração da inflamação nos tecidos adjuntos à lesão.

6 A divergência na sintomatologia nervosa entre os casos possivelmente ocorreu pelas
7 diferenças da intensidade da lesão no neurópilo e sua localização (Coutinho & Tarragô
8 1976, Oruç 2005, Riet-Correa et al. 2002, Del Fava et al. 2010, Konradt et al. 2016); além
9 disso, é provável que a cronicidade tenha influência no grau de lesão no SNC (Barros et al.
10 2006, Rock et al. 2008); já que três bovinos (bovinos 1, 3 e 6) que apresentavam lesões
11 granulomatosas compressivas sem alterar o tecido nervoso adjacente ou que o destruía de
12 forma discreta não evidenciavam distúrbios clínicos neurológicos, enquanto os bovinos
13 com lesões extensas e acentuadas (bovinos 2, 4 e 5) apresentavam sinais secundários as
14 respectivas áreas afetadas.

15 No único caso em que o líquido foi examinado constatou-se linfocitose, sugerindo que a
16 utilização de rotina desta técnica poderá ajudar no diagnóstico da forma nervosa da
17 tuberculose. Em humanos com tuberculose encefálica constatou-se alta população celular
18 linfocítica na citologia do líquido; entretanto, nos casos em que a infecção se apresenta na
19 fase inicial, poderão ser visualizados neutrófilos em maior quantidade (Coutinho & Tarragô
20 1976, Rock et al. 2008, Marassi et al. 2013). Além da avaliação de qual o tipo de célula
21 inflamatória está presente no líquido, pode ser realizada a técnica de Ziehl-Neelsen para
22 visualização do agente na citologia do fluido cerebrospinal, embora a ausência de bacilos
23 não implique na exclusão da doença (Wilkins et al. 1986).

24 A mineralização observada no neuropilo da ponte e cerebelo do bovino 2 que não era
25 afetado pelos granulomas da tuberculose, pode ter ocorrido de forma metastática
26 inicialmente nos vasos e posteriormente expandindo-se para o tecido, como é observado em
27 doenças crônicas caquetizantes, como a tuberculose e a paratuberculose (Zachary 2013,
28 Driemeier et al. 1999). O mesmo processo pode ter desenvolvido a mineralização nos vasos
29 uterinos do bovino 6.

30 Os achados histopatológicos evidenciaram ainda lesões acentuadas na túnica íntima dos
31 vasos meningeos, descritas anteriormente em casos de tuberculose encefálica humana

1 (Coutinho & Tarragô 1976), que enfatizam a invasão do agente no SNC através da via
2 hematogena. Em humanos, mediante angiografias, é possível identificar tortuosidade e
3 aneurismas provocados pela compressão vascular, vasculites e/ou proliferação da túnica
4 íntima dos vasos (Coutinho & Tarragô 1976). Os vasos meningeos são, portanto, os
5 primeiros a serem comprometidos pela inflamação e a proliferação da túnica íntima pode
6 ser suficiente para provocar oclusão completa do lúmen vascular, e em consequência
7 ocorrer casualmente quadros de infartos encefálicos (Oruç 2005, Zachary 2013).

8 CONCLUSÕES

9 Conclui-se que a ocorrência da tuberculose no sistema nervoso de bovinos na Paraíba
10 não predispõe de idade, afetando bovinos jovens e adultos, de diversas raças, sem haver
11 sinais clínicos precisos. As diferentes idades, a lesão vascular e a presença de lesões em
12 outros órgãos sugerem que as infecções ocorreram por disseminação a partir de outros
13 órgãos pela via hematogena. Deve-se incluir a tuberculose encefálica como diagnóstico
14 diferencial de outras infecções (bacterianas, micológicas e virais) e neoplasias do SNC.

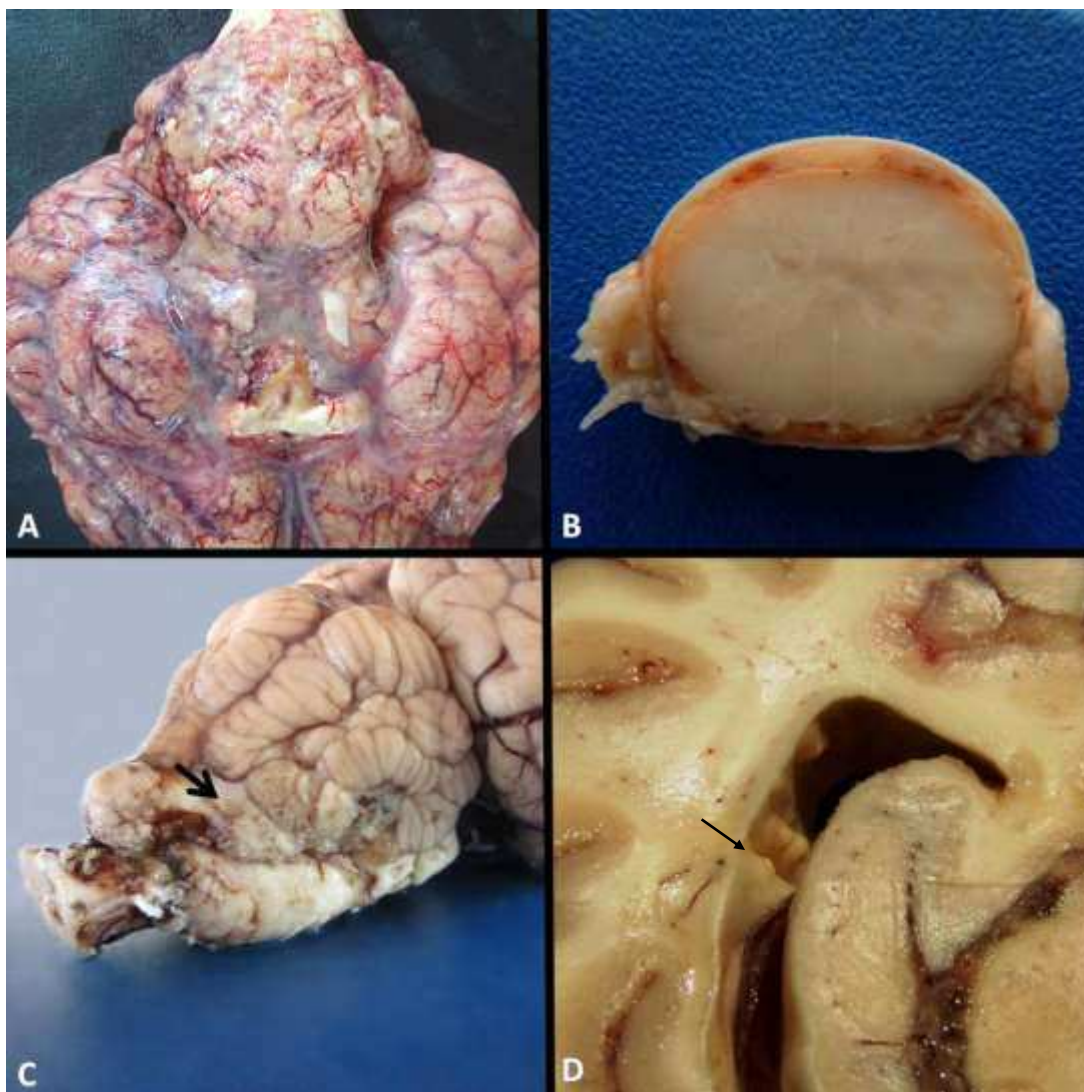
15 REFERÊNCIAS

- 16 Andrezza D., Boos, G.S., Boabaid F.M., Wouters A.T.B., Wouters F., Souza S.O.,
17 Menegat M.B. & Driemeier D. 2015. Caracterização histológica e imuno-histoquímica
18 das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. *Pesq.*
19 *Vet. Bras.* 35(2):129-136.
- 20 Borges P.C., Nakagaki K.Y.R. Lopes P.R.F., Souza B., Utiumi K. & Raymundo D.L. 2013.
21 Tuberculose meningeana e na forma de tubérculos isolados no sistema nervoso central
22 de uma novilha holandesa. *Arch. Vet. Sci.*12(2):185-187.
- 23 Coutinho, L.M.B. & Tarragô, R.P.1976.Tuberculose meningoencefálica na infância: estudo
24 anatomo-patológico de 10 casos. *Arq. Neuropsiquiatr.*34(2):127-134.
- 25 Del Fava C., Roxo E., Baldassi L., Cunha E.M.S. & Cabral A.D. 2010. Granulomatous
26 meningo myeloencephalitis in a calf caused by *Mycobacterium bovis*. *Arq. Inst. Biol.*
27 77(2):335-338.
- 28 Domingo M., Vidal E. & Marco A. 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Res. Vet.*
29 *Sci.*97:20-29.
- 30 Dyce K.M., Sack W.O. & Wensing C.J.G. 2010. O Sistema Nervoso. pp. In: *Ibid.* (Eds),

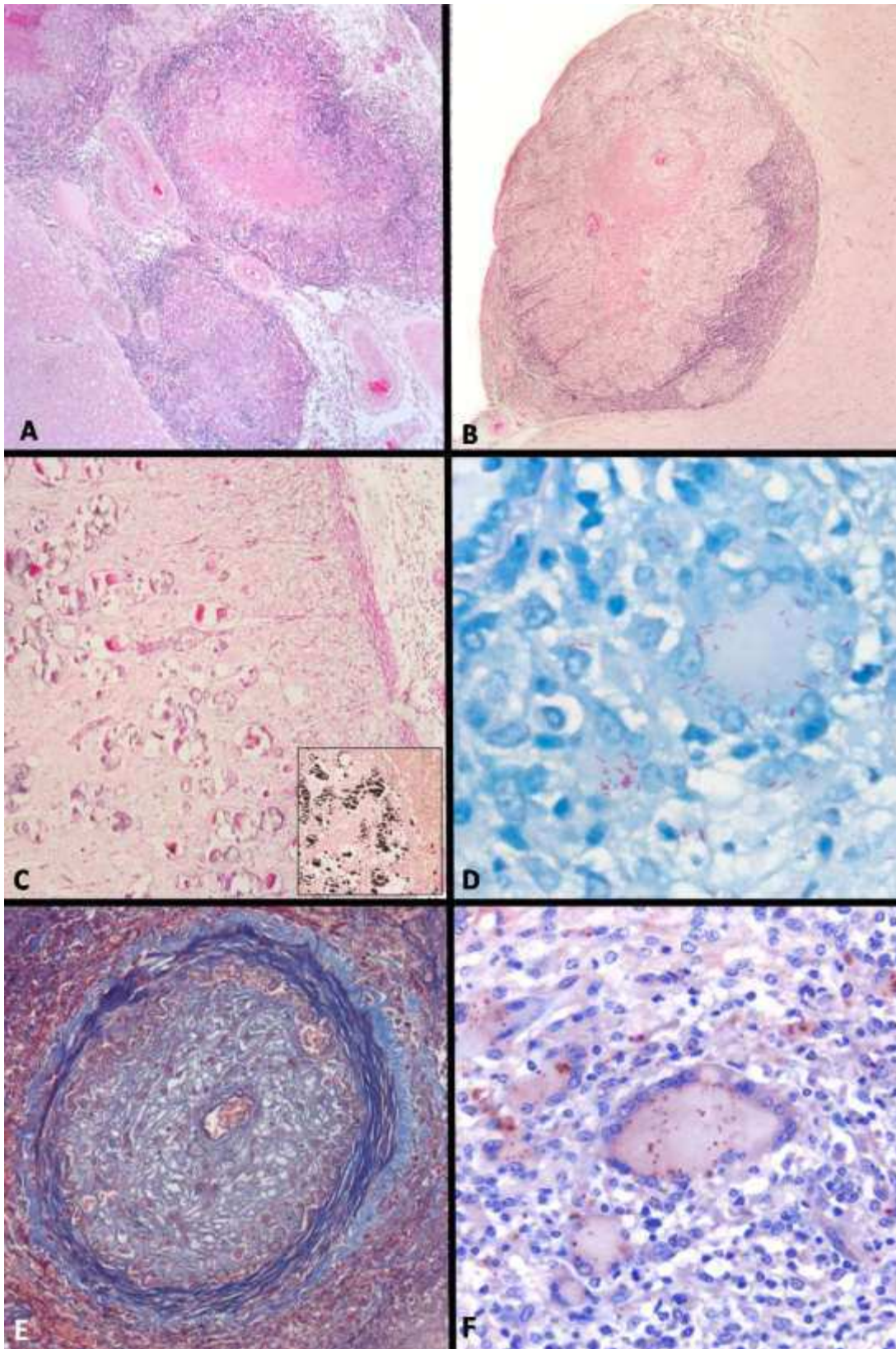
- 1 Tratado de Anatomia Veterinária. 4nd ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- 2 Galiza G.J.N., Silva, M.L.C.R., Dantas A.F.M., Simões, S.V.D. & Riet-Correa F. 2010.
- 3 Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq.Vet. Bras.*
- 4 30(3):267-276.
- 5 Konradt G., Bassuino D.M., Bianchi M.V., Bandinielli M.B., Driemeier D. & Pavarini S.P.
- 6 2016. Neurotuberculosis in cattle in southern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*
- 7 48(5):1089-1094.
- 8 Matos A. C., Figueira L., Martins M. H., Matos M., Morais M., Dias A. P., Pinto M. L. &
- 9 Coelho A. C. 2014. Disseminated *Mycobacterium bovis* infection in red foxes
- 10 (*Vulpes vulpes*) with cerebral involvement found in Portugal. *Vector Borne Zoonotic*
- 11 *Dis.* 14(7):531-533.
- 12 Oruç E. 2005. Meningoencephalitis tuberculosa in a holstein cow. *Vet. Pathol.* 42: 856-858.
- 13 Ribas N.L.K.S, Carvalho R.I., Santos A.C., Valençuela R.A., Gouveia A.F., Castro M.B.,
- 14 Mori A.E. & Lemos R.A.A. 2013. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato
- 15 Grosso do Sul: 1082 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 33(10):1183-1194.
- 16 Riet-Correa F., Riet-Correa G. & Schild A.L. 2002. Importância do exame clínico para o
- 17 diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. *Pesq. Vet.*
- 18 *Bras.* 22(4):161-168.
- 19 Riet-Correa F. & Garcia M. 2007. Tuberculose. p. 432-442. In: Riet-Correa F., Schild A.L.
- 20 Lemos R.A.A. & Borges J. R. J. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3nd ed. Vol
- 21 1. Palloti, Santa Maria.
- 22 Rock R.B., Olin M., Baker C.A., Molitor T.W. & Peterson P.K. 2008. Central nervous
- 23 system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(2):243-
- 24 261.
- 25 Roxo E. 1997. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Rev. Cienc. Farm.* 18(1):101-
- 26 108.
- 27 Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros C.S.L. 2000. Doenças do sistema
- 28 nervosa central em bovinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):113-118.
- 29 Tzard, I. R. 2014. Hipersensibilidade do tipo IV: Hipersensibilidade tardia, p. 365-375. In:
- 30 *Ibid.* (Eds), *Imunologia Veterinária*. 9nd ed. EditoraElsevier, Rio de Janeiro.
- 31 Wilkins E.G.L., Griffiths R.J., Roberts C. & Green H.T. 1986. Tuberculous meningitis due

- 1 to *Mycobacterium bovis*: a report of two cases. Postgrad. Med. J. 62:653-655.
2 Zachary, J. F. 2013. Sistema Nervoso. p. 803-804 In: Zachary, J. F. & McGavin, M. D.
3 (Eds). Bases da Patologia em Veterinária. 5nd ed. Elsevier, Rio de Janeiro.

4 **Legendas das Figuras**



- 5
6 Fig 1: Tuberculose neurológica em bovinos. A) Encéfalo apresentando espessamento das
7 leptomeninges na região basilar (Bovino 2). B) Medula cervical com espessamento das
8 meninges (Bovino 5). C) Encéfalo com herniação cerebelar e presença de massa protrusa na
9 base do cerebelo (seta) (Bovino 4). D) Corte do encéfalo evidenciando projeções na parede
10 do ventrículo lateral esquerdo (Bovino 2) (seta).



1

2 Fig 2: Tuberculose neurológica em bovinos. A) Pedúnculo cerebelar observa-se
 3 espessamento das leptomeninges por múltiplos granulomas com áreas necróticas centrais

1 (Bovino 4). HE. Obj.10 B) Córtex frontal com granuloma meningeano comprimindo o
 2 neurópilo adjacente (Bovino 2). HE, Obj. 5x. C) Ponte, mineraliação do tecido nervoso
 3 (Bovino 2). HE. Obj. 10. Em detalhe, coloração de Von Kossa, demonstrando as áreas
 4 mineralizadas em tom enegrecido. D) Córtex cerebral, bastonetesalcoool-ácido resistentes,
 5 intracitoplasmáticos em célula gigante multinucleada do tipo Langerhans e em macrófagos
 6 em meioa lesão (Bovino 5). Ziehl-Neelsen. Obj. 100. E) Córtex cerebral, vaso meningeano
 7 evidenciando túnica íntima acentuadamente proliferada em tom de azul e com redução do
 8 diâmetro do lúmen (Bovino 6). Tricrômico de Masson. Obj. 20. F) Córtex cerebral,
 9 imunomarcção positiva com anti-*Mycobacteriumtuberculosis* no citoplasma de
 10 macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas (Bovino 4). Cromógeno DAB,
 11 Obj. 40.

Quadro 1: Raça, sexo, idade, sinais clínicos e localização das lesões em seis casos de bovinos com lesões de tuberculose no sistema nervoso

Bovino	Raça	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Localização das lesos
1	Sindi	Macho	Adulto	Tosse, cansaço, perda de peso e linfadenomegalia Incoordenação, debilidade, diminuição da	SNC, pulmão e linfonodos mediastínicos Pulmão e linfonodos mediastínicos, rim
2	Pardo Suíço	Macho	Um ano	sensibilidade dos membros pélvicos, postura de cão sentado e incontinência urinária	
3	Mestiço Holandês	Fêmea	Nove anos	Sem sinais clínicos. Foi eutanasiado por ser positivo a brucelose Perda de equilíbrio, discreto trismo	SNC SNC, pulmão , fígado
4	Sem Raça Definida	Fêmea	Dois anos	mandibular, nistagmo, torneio e quedas repentinas Decúbito lateral,	SNC, pulmão e linfonodos mediastínicos
5	Girolando	Fêmea	Seis meses	opistótono, nistagmo, estrabismo ventro medial, sensibilidade reduzida na face e tetraparesia	SNC, pulmão, linfonodos mediastínicos, mesentéricos e
6	Mestiço Holandês	Fêmea	8 anos	Perda de peso, dispneia acentuada, cegueira com opacidade da córnea do olho esquerdo.	intramamário, rim, fígado, globo ocular, diafragma, baço, glândula mamária, útero e coração

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Conclui-se que ovinos intoxicados por *Tephrosia cinerea* podem desenvolver encefalopatia hepática em consequência de fibrose periacinar, devendo esta doença ser incluída no diagnóstico diferencial das doenças do sistema nervoso dos ovinos. A tuberculose encefálica em bovinos é frequente na Paraíba, onde há uma alta prevalência da enfermidade, devendo ser incluída no diagnóstico diferencial de doenças que afetam o Sistema Nervoso Central. A micobacteriose não possui predileção por sexo ou idade e atinge bovinos com lesões pulmonares e em outros órgãos, sugerindo que a lesão encefálica é secundária à disseminação hematogena da bactéria. A localização das lesões na região basilar encefálica e as alterações vasculares nas meninges na região do Ciclo de Willis sugerem que a bactéria penetrou, primariamente, pela via sanguínea nessa estrutura anatômica.

ANEXOS

Normas de submissão da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*short communications*) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (*paper charge*) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

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

b) O (s) Autor (es) deve (m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a

mesma assumam importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos 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 (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente 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 artigos 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;

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 artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

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

a) A digitação 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 no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos 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 artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página

em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos 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 artigo 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 artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, 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. Os gráficos (=Figuras) 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 do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, 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.