

GASTROPATIA EM COELHOS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA PELA PLANTA CALCINOGENICA *Solanum malacoxylon*¹

JOSÉ ANTONIO MORAÑA², SEVERO SALES DE BARROS³, DAVID DRIEMEIER⁴ e YARA ETHUR FLÔRES⁵

ABSTRACT.- Moraña J.A., Barros S.S., Driemeier D. & Flôres Y.E. 1994. [Gastropathy in rabbits experimentally induced by the calcinogenic plant *Solanum malacoxylon*.] Gastropatia em coelhos experimentalmente induzida pela planta calcinogênica *Solanum malacoxylon*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 14(1):35-42. Depto Patologia, Univ. Fed. Sta Maria, Santa Maria, RS 97119-900, Brazil.

Rabbits of both sexes were used daily either orally or intravenously with an aqueous extract of *Solanum malacoxylon* equivalent to 100 mg of the dried leaves of the plant per kilogram of body weight. The rabbits developed a gastropathy associated with loss of appetite, depression and diarrhea. All rabbits were necropsied within 14 days after treatment. Gross lesions consisted of hyperemia and edema of the mucosa with occasional hemorrhages and necrotic foci in the fundus region of the stomach; white streaks could be observed through its serosal surface. Slicing of these areas revealed hard, granular and dry mineral deposits. The main microscopic lesions consisted of marked mineralization of the muscle layers of the stomach and arterial walls, edema of the lamina propria and submucosa and hemorrhages in the mucosa. Numerous multinucleated giant cells were observed in the gastric mucosa, some of which containing mineral deposits in their cytoplasm. Early changes were observed by electron microscopical examination in the smooth muscle cells of the muscle layers, muscularis mucosae and lamina propria of the stomach and of the arterial walls. The morphological changes in the smooth muscle cells could possibly result as an expression of genes activated by 1,25 (OH)₂D₃ contained in the plant. In the more advanced stages these modified muscle cells suffered degeneration, necrosis and mineralization. In the extracellular matrix calcium crystals were observed associated with membrane-bound cellular fragments which varied in size from 200nm to 1 μm. These were interpreted as matrix vesicles. The multinucleated giant cells contained needle-like mineral deposits resembling apatite crystals which were found loose in their cytoplasm as endocellular products. Rarely these deposits were membrane-bound. Affected mitochondria had granular mineral precipitations on the cristae which suggests this organelle as the initial site of calcium precipitation in the giant cells. This type of giant cells was also observed in the mucosa of the stomachs which showed no calcification.

INDEX TERMS: Plant poisoning, *Solanum malacoxylon*, gastropathy, rabbit.

SINOPSE.- Trinta coelhos jovens de ambos os sexos foram dosificados por via oral ou por via endovenosa com extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* equivalente a 100 mg de folhas dessecadas por kg de peso vivo. Os animais desenvolveram uma gastropatia com sintomas de anorexia, depressão e diarreia; todos os animais, mortos espontaneamente ou sacrificados, foram necropsiados em um período de até 14 dias após a administração do ex-

trato. Foram feitos estudos de microscopia ótica e eletrônica de transmissão em espécimes do estômago. As lesões macroscópicas observadas nos animais intoxicados consistiram em hiperemia e edema da mucosa gástrica, ocasionais áreas de necrose na mucosa fúndica e estriações esbranquiçadas nas capas musculares, visíveis através da serosa. O corte sobre estas áreas revelou depósitos minerais de aspecto granular, secos e de consistência dura.

As principais lesões microscópicas consistiram de uma marcada mineralização das camadas musculares do estômago e das paredes arteriais, edema da lâmina própria, particularmente da zona foveolar e da submucosa e hemorragias capilares na mucosa. Um grande número de células gigantes multinucleadas foram observadas na mucosa, algumas das quais continham minerais no seu citoplasma. As alterações ultraestruturais apareceram precocemente nas células musculares lisas e se caracterizaram por dilatação do retículo endoplasmático, aumento do número de mitocôndrias, diminuição das vesículas pinocitóticas das miofibrilas e

¹ Aceito para publicação em 6 de dezembro de 1993.

Este trabalho é parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

² Faculdade de Veterinária, Universidad de la República, Montevideo, Uruguai.

³ Bolsista pesquisador do CNPq, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900 Santa Maria, RS.

⁴ Doutorando no Instituto de Patologia da Faculdade de Veterinária, Justus Liebig-Universitaet, Giessen, República Federal da Alemanha.

⁵ Bióloga, Departamento de Patologia, UFSM.

densificações citoplasmáticas. Estas alterações morfológicas poderiam ser o resultado da expressão de gens ativadas pelo 1,25(OH)₂D₃ contido na planta. Na matriz extracelular foram observados cristais de cálcio associados a fragmentos celulares recobertos por membranas de tamanhos variáveis – entre 200 nanômetros e um micrômetro, interpretadas como vesículas matriciais. As células gigantes presentes em abundância na lâmina própria exibiam depósitos minerais em forma de agulhas, em alguns casos rodeados por membranas e, em outros, no interior do citoplasma como um produto endocelular. As mitocôndrias afetadas apresentavam depósitos minerais de aspecto granular sobre as cristas. Este tipo celular também foi observado na mucosa de estômagos que até o momento não tinham sofrido o processo de calcificação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Intoxicação por planta, *Solanum malacoxylon*, gastropatia, coelhos.

INTRODUÇÃO

Em diversas partes do mundo têm sido descritas calcinose sistêmicas em animais de pastoreio, doenças de evolução crônica, caracterizadas pela deposição de sais de cálcio nos tecidos moles. O desenvolvimento destas calcinose foi relacionado com a ingestão de diversas plantas pelos herbívoros (Collier 1927, Worker & Carrillo 1967, Carrillo et al. 1971, Döbereiner et al. 1971, Dirksen et al. 1970, Krook et al. 1975, Wasserman et al. 1975, Morris 1982, Riet-Correa et al. 1987).

A toxicidade destas plantas está associada a um glicosídeo do 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃) e é semelhante à da vitamina D (Wasserman 1975, Wasserman et al. 1975, 1976). Os animais intoxicados mostram calcificação que envolve as fibras elásticas da parede das artérias, o rim, o coração, o pulmão e outros tecidos (Worker & Carrillo 1967, Camberos et al. 1970, Castro 1970, Barros et al. 1970, Carrillo et al. 1971, Döbereiner et al. 1975, Done et al. 1976, Nosedá et al. 1976, Barros et al. 1981).

Nos animais afetados por calcinose são descritos sinais clínicos de doença gastrointestinal como perda e depravação do apetite e em alguns casos diarreia (Arnold 1954, Worker & Carrillo 1967, Camberos et al. 1970, Done et al. 1976, Nosedá et al. 1976), mas somente alguns autores descrevem lesões em órgãos do sistema digestivo (Arnold & Bras 1956, Rossi et al. 1969, Barros et al. 1970). Em coelhos intoxicados experimentalmente por *Solanum malacoxylon* foram observadas anorexia, diarreia e morte (Barros 1990, dados não publicados).

Neste trabalho são descritas as alterações do estômago induzidas pela intoxicação experimental com *Solanum malacoxylon* em coelhos, através do estudo macroscópico, microscópico e ultraestrutural e discutidos os mecanismos patogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Foram utilizados trinta e dois coelhos jovens de ambos os sexos, com pesos variando entre 700 e 2000 g e idades entre 45 e 102 dias; os animais eram alojados em gaiolas metálicas e recebiam ração granulada para coelhos⁶ e água *ad libitum*.

Vinte e três coelhos receberam diariamente extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* (SM) correspondente a 100 mg de folhas secas por quilograma de peso corporal, via sonda gástrica. Sete coelhos receberam a mesma dosagem do extrato, previamente esterilizado por filtração, via endovenosa. Dois coelhos não receberam o extrato e foram mantidos como testemunhas. Os animais foram controlados durante todo o experimento. Os que morreram espontaneamente e aqueles sacrificados *in extremis* foram necropsiados. Os sobreviventes e os testemunhas foram sacrificados por exangüinação e necropsiados no 14º dia após o início do experimento, após prévia narcose por éter.

Colheita e processamento das amostras

De todos os animais foram colhidas amostras do estômago para microscopia ótica e, de alguns casos selecionados, para microscopia eletrônica. As amostras para microscopia ótica foram obtidas após prévia ligadura do esôfago e do duodeno e injeção de formalina a 10% na luz do órgão até se conseguir sua distensão. A seguir os estômagos foram imersos em recipiente com formalina a 10%. Nos estômagos, dos quais se retiraram amostras para microscopia eletrônica, as incisões realizadas foram suturadas para depois se proceder de forma semelhante à relatada anteriormente. Após a fixação, fragmentos do cárdia, corpo e piloro foram processados para histologia, incluídos em parafina, cortados a 5 micrômetros e corados pela técnica da hematoxilina e eosina. Cortes selecionados foram corados pela técnica de von Kossa, azul de toluidina e Grimelius (Culling et al. 1985).

As amostras para microscopia eletrônica foram retiradas da curvatura, região fúndica, de 5 animais, sendo um testemunha. Os fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato, a 4°C, por 2h, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato de sódio, por uma hora, a 4°C, desidratados em etanóis e incluídos em Epon. Cortes semifinos foram corados com azul de metileno e os ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

Extrato da planta

O extrato de SM foi preparado colocando-se folhas dessecadas à sombra em água destilada, na proporção de 28,8 g de folhas secas moídas, em 576 ml de água destilada, no refrigerador a 4°C. Após 24 h a suspensão foi filtrada em gaze e conservada no refrigerador. Parte do extrato foi esterilizado por filtração para utilização endovenosa.

RESULTADOS

Sintomatologia

A anorexia foi o primeiro sintoma observado, tanto nos coelhos dosificados por via oral quanto naqueles que receberam o extrato via endovenosa. Os animais mostraram diminuição do apetite, dentro das primeiras 24h após o início do experimento. Entre 48 e 72 horas, a grande maioria dos animais apresentou diarreia, encontrando-se matérias fecais pastosas e muco, às vezes coagulado na forma de cilindros.

⁶ Ração Guabi para coelhos.

Tanto machos como fêmeas foram afetados, porém houve considerável variação individual. Dez animais morreram entre 72 e 96 horas após a primeira dosificação. Os outros animais reduziram notavelmente o consumo de alimentos e água, mas houve uma posterior recuperação do apetite, o qual se manteve sempre em níveis muito inferiores ao normal e alternando-se com períodos de anorexia. Todos os sobreviventes desenvolveram debilidade e se mostraram apáticos. Progressivamente os animais foram se recuperando, sem, porém, atingirem o estado normal. Em alguns deles, uma vez desaparecida a diarreia, houve constipação com matérias fecais pequenas, escuras, secas e duras. Observou-se ainda um atraso no crescimento dos animais dosificados em relação aos testemunhas. Oito animais com cerca de 45 dias não evidenciaram outras alterações além de uma discreta diminuição do apetite e atraso do crescimento.

Alterações macroscópicas

Dez animais com sinais clínicos de doença, não apresentaram lesões do estômago à inspeção pós-morte. Nos demais foram observadas, na superfície serosa do estômago, estriações esbranquiçadas, lineares, dispostas de forma radiada e perpendicular à grande curvatura. O corte sobre as áreas que apresentavam as estriações esbranquiçadas revelou, nas capas musculares, depósitos

minerais de aspecto granular e seco, de cor branca e consistência dura. O estômago mostrou avermelhamento, focal ou difuso, da superfície mucosa e espessamento da parede. De um modo geral, as porções fúndicas e o corpo foram as mais afetadas. Observou-se também aumento da secreção mucosa, a qual, em alguns casos, foi de volume apreciável e em outros encontrava-se misturada com sangue.

A presença de edema entre a mucosa e as camadas musculares foi a causa do espessamento da parede do estômago.

Alterações microscópicas

As lesões microscópicas encontradas no estômago afetavam a mucosa, a lâmina própria, a muscular e as artérias da submucosa e da muscular. A mucosa gástrica estava lesada em diferentes graus de acordo com o indivíduo e a zona do estômago. A zona do corpo mostrou as alterações mais severas. Em geral as lesões da mucosa foram observadas no seu terço mais superficial, mas as glândulas conservaram seu aspecto normal. Havia edema localizado na região foveolar. As células de revestimento adquiriram aspecto irregular com citoplasma vacuolizado. Em nove animais foram vistas, na mucosa, hemorragias capilares de distribuição focal. Em quatro deles havia hemorragias maiores e as capas superficiais da mucosa

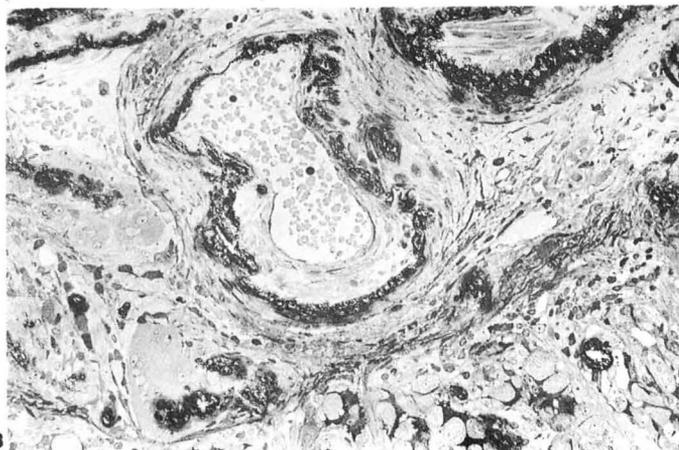
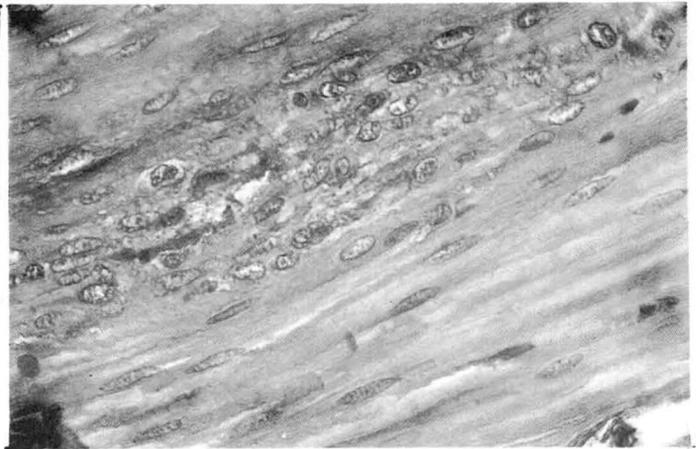
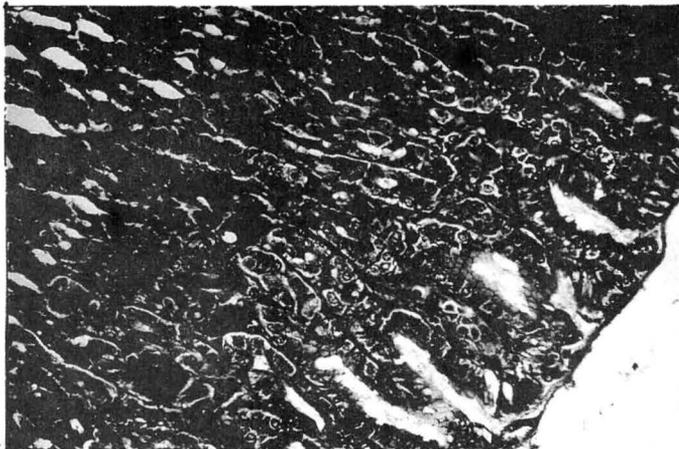


Fig. 1. Mucosa do estômago. Algumas células gigantes são observadas no interstício. Não há sinais de mineralização. HE, obj. 6,3.

Fig. 2. Muscular do estômago. Alterações precoces no processo de mineralização das camadas musculares. Observam-se grupos de miócitos com núcleos tumefeitos, fina vacuolização do citoplasma e discreta basofilia. HE, obj. 16.

Fig. 3. Espessamento da íntima e calcificação da parede de artéria da submucosa do estômago. Células gigantes com mineralização no citoplasma podem ser observadas no interstício. Epon, Azul de metileno, obj. 16.

sofreram diversos graus de erosão. Estas erosões por vezes atingiam a muscular da mucosa, induzindo sempre uma reação inflamatória discreta.

Em alguns casos foram observadas colônias bacterianas, acompanhadas por infiltrados polimorfonucleares com uma maior esfoliação e necrose do epitélio de revestimento. Nestes casos evidenciava-se congestão mais acentuada, hemorragias e espessamento difuso da submucosa por edema. A topografia superficial foi mantida, interessando a mucosa em toda sua extensão, sem ultrapassar a muscular da mucosa. Foi usada a coloração do azul de toluidina em todos os casos que apresentaram marcado engrossamento da lâmina própria por edema, sem, porém, ter sido detectada mastocitose.

Pequenos depósitos focais de uma substância basofílica positiva à coloração de von Kossa foram vistos entre as células epiteliais, na luz das glândulas e no tecido

conjuntivo interglandular da região fúndica. Tais depósitos foram detectados também no citoplasma de células gigantes tipo corpo estranho, encontradas na mucosa. Este tipo celular era numeroso naqueles animais que receberam dosagens de SM por períodos superiores aos 8 dias, inclusive na mucosa de estômagos que não apresentavam depósitos minerais (Fig. 1). Células gigantes sem depósitos minerais no seu interior também foram encontradas com frequência. Na muscular, sobretudo na proximidade de vasos, também foram vistos depósitos de minerais junto a células musculares de núcleos tumefeitos e citoplasma vacuolizado. Em algumas ocasiões estes depósitos foram observados como granulações intracitoplasmáticas positivas à coloração de von Kossa.

As camadas musculares foram as mais afetadas, havendo uma ligeira basofilia associada à tumefação celular (Fig. 2), até uma intensa deposição de material forte-

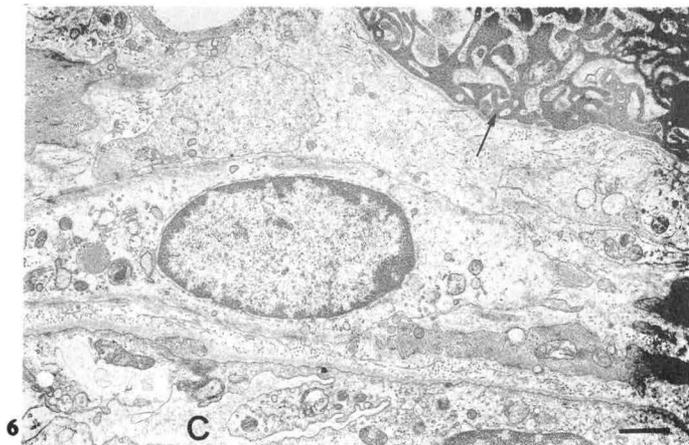
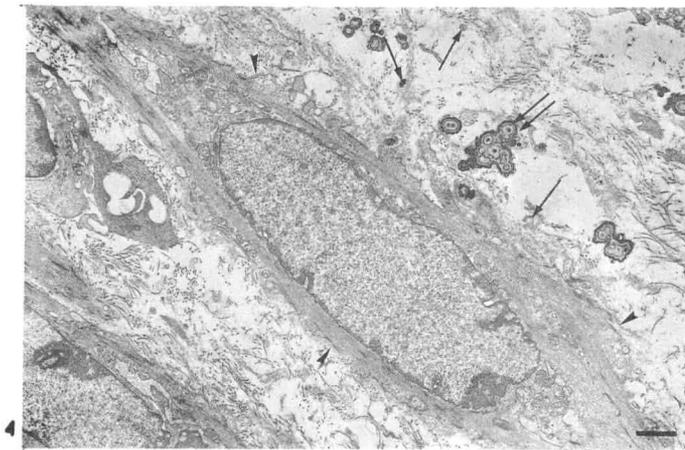


Fig. 4. Parede do estômago. Célula muscular lisa modificada. Dilatação do retículo endoplasmático e aumento do número de organelas. Fragmentação da lâmina basal (ponta de seta). Diminuição acentuada do número de vesículas de pinocitose. No interstício observam-se estruturas citoplasmáticas delimitadas por membrana e interpretadas como vesículas matriciais (seta). Deposição de cálcio na matrix extracelular em arranjos laminares concêntricos de faixas claras e escuras (dupla seta). Barra 1 μ m.

Fig. 5. Extensas áreas de mineralização entre células musculares lisas modificadas da parede do estômago. As áreas mineralizadas mostram um aspecto laminar concêntrico formando placas por coalescência. Barra 2 μ m.

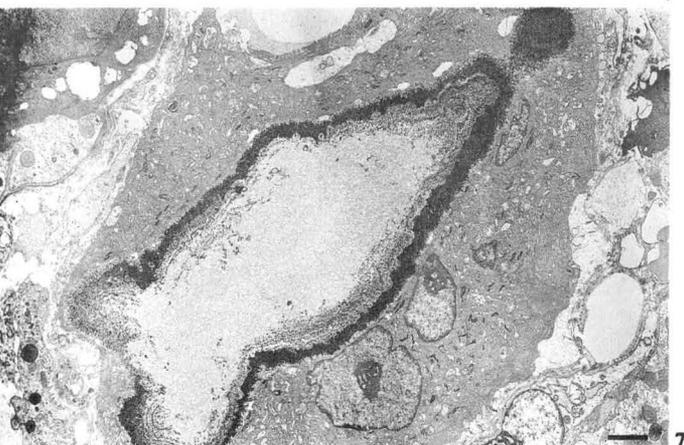
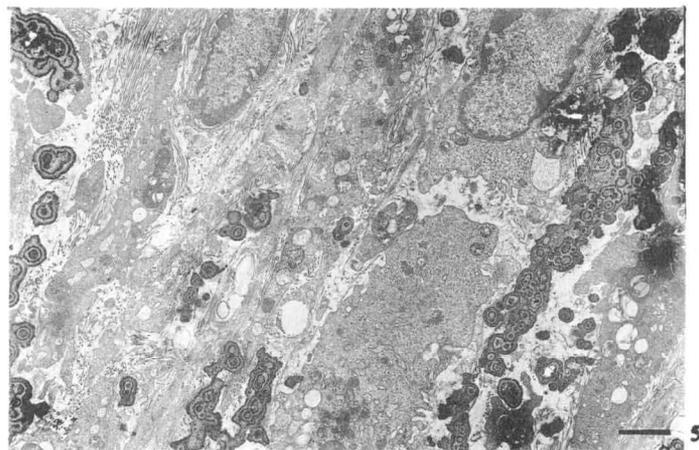


Fig. 6. Célula muscular lisa degenerada na lâmina própria da mucosa do estômago. Capilar (C). Célula principal de glândula gástrica (seta). Barra 1 μ m.

Fig. 7. Célula gigante na lâmina própria da mucosa do estômago. Grande estrutura mineralizada no citoplasma. Barra 2 μ m.

mente basófilico positivo à coloração de von Kossa. Estes depósitos, em alguns casos, se encontravam entre as fibras musculares lisas formando uma imagem reticulada. As fibras entre tais depósitos minerais freqüentemente estavam fragmentadas e separadas, podendo, contudo, ser identificado o seu contorno. A reação inflamatória que acompanhava estes depósitos era variável, sendo, em geral, escassa e consistindo basicamente de macrófagos. As três capas principais que compõem a muscular encontravam-se afetadas com a mesma intensidade. A distribuição das lesões nas capas musculares era variável, desde pequenos focos até a sua substituição, em certa extensão, por depósitos minerais colocados em lâminas que se assemelhavam às fibras musculares pré-existentes. As células musculares lisas apareciam hipertróficas, vacuolizadas, carregadas de depósitos granulares positivos à coloração de von Kossa e com o núcleo aumentado de tamanho. Embora não com tanta freqüência como na mucosa, também foram encontradas células gigantes entre as fibras musculares lisas.

As lesões vasculares foram observadas nas artérias da lâmina própria, da submucosa e da muscular e consistiam desde perda das ondulações da lâmina elástica até a deposição de um material basófilico que interessava parcial ou totalmente a média do vaso. Estas alterações não foram observadas uniformemente em todos os vasos. Os depósitos eram constituídos de agregados basófilicos positivos à coloração de von Kossa, cristalinos e granulares, em geral orientados longitudinalmente entre as fibras elásticas. Proliferação da íntima e edema sub-endotelial foram observados com freqüência (Fig. 3).

Todas essas alterações diminuíam de intensidade à medida que se reduzia o lúmen dos vasos; os capilares não apresentavam alterações dignas de nota.

Os cortes histológicos corados pela técnica de Grime-lius não mostraram alterações no número das células entero-endócrinas quando comparados com os dos testemunhas.

Alterações ultraestruturais

Nas capas musculares do estômago verificou-se, precocemente, tumefação das células musculares lisas, com dilatação do retículo endoplasmático e aumento do número de organelas. Em geral havia uma acentuada diminuição das miofibrilas e condensações citoplasmáticas. A lâmina basal estava fragmentada e por vezes, ausente (Fig. 4). As vesículas de pinocitose estavam diminuindo em número. Mergulhados na matriz extracelular, mas próximas a estas células modificadas, encontravam-se fragmentos citoplasmáticos delimitados por membrana, de tamanhos variáveis entre 200 nanômetros e um micrômetro. As referidas estruturas sofreram mineralização e foram interpretadas como vesículas matriciais. Estas mineralizações apareciam como estruturas de forma concêntrica de faixas claras e escuras que, por coalescência, formavam grandes placas que lembravam o aspecto de um mapa geográfico (Fig. 5). Em fases mais avançadas ocor-

ria necrose e mineralização dos miócitos, dando lugar a extensas massas calcáreas. Desde as fases bem precoces, estas áreas de mineralização eram infiltradas por macrófagos, eventualmente havendo formação de células gigantes tipo corpo estranho.

A muscular da mucosa apresentou alterações semelhantes às das capas musculares. As artérias muitas vezes mostravam tumefação do endotélio e um maior ou menor grau de edema da íntima. Com freqüência a lâmina elástica interna perdia sua natural ondulação, exibindo, na periferia, deposição de cálcio em formações concêntricas semelhantes às descritas nas capas musculares. Os miócitos da parede arterial também mostravam alterações similares àquelas já descritas nas células da parede muscular.

Na lâmina própria, as alterações ultraestruturais mais evidentes foram degeneração e necrose das células musculares (Fig. 6). O edema, em particular da região foveolar, era abundante e o interstício estava preenchido por uma substância granular mais eletrodensa.

As células mucosas de revestimento exibiam acentuada dilatação do retículo endoplasmático e, em alguns casos, um número considerável de corpos residuais, alguns de grande tamanho, no interior dos quais se encontravam grânulos de secreção e restos de organelas. As células gigantes, presentes em abundância na lâmina própria, apresentavam núcleos lobulados e membrana plasmática com numerosas ondulações formadas por projeções citoplasmáticas que se imbricavam umas com as outras. Estas células, ocasionalmente, continham depósitos minerais, formando estruturas concêntricas não delimitadas por membrana, de formas variadas e constituídas por cristais acidulares, em geral dispostos de forma radiada, que alcançavam até 28 μm no eixo maior e aparentemente não produziam grave dano celular (Fig. 7). Algumas células gigantes apresentavam mitocôndrias com cristas desorientadas e fragmentadas e depósitos de estrutura granular densa (Fig. 8); em outras podiam ser encontrados cristais

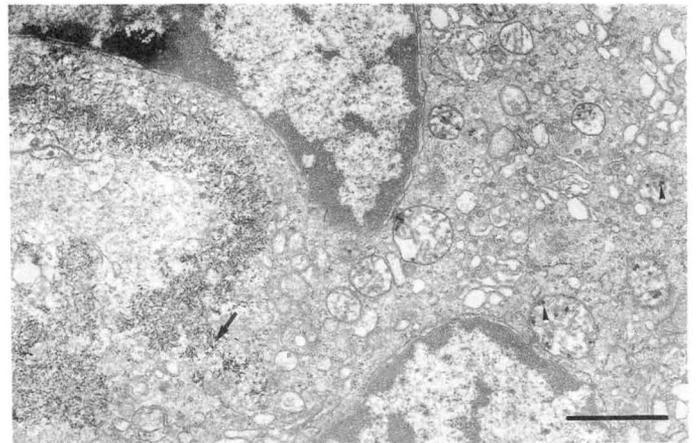


Fig. 8. Eventos iniciais da deposição de cálcio no citoplasma de célula gigante na lâmina própria da mucosa gástrica. Grânulos eletrodensos nas cristas das mitocôndrias (ponta de seta). Formação de finos cristais de apatita no citosol (seta). Barra 2 μm .

de sais de cálcio rodeados por membranas, aparentemente não relacionados com organelas.

As células entero-endócrinas não mostravam alterações quando comparadas com aquelas dos animais testemunhas.

Não foram observadas diferenças significativas, tanto sob o ponto de vista clínico, como das alterações macroscópicas e histopatológicas, entre os animais que receberam o extrato via sonda gástrica e via endovenosa. Digno de nota é o fato de que os 8 animais com cerca de 45 dias não exibiram alterações macroscópicas ou histopatológicas.

DISCUSSÃO

A administração de 2 ml/kg/dia de um extrato aquoso de SM, correspondente a 100 mg da planta seca, causou, com rapidez, sinais clínicos de intoxicação e um grau variável de gastropatia em todos os coelhos com exceção dos 8 animais com 45 dias de idade. Os sinais clínicos apareceram a partir das 24 horas e as mortes ocorreram entre as 72 e 96 horas após a primeira dosificação. Foi observado um atraso no crescimento dos animais intoxicados com SM, já descritos em aves (Ross et al. 1971), bovinos (Döbereiner et al. 1975) e suínos (Done et al. 1976). Os sinais de intoxicação eram bastante regulares e incluíam perda de apetite, redução do peso corporal, diarreia e eventualmente morte. Com exceção da diarreia, estes sinais foram descritos para bovinos (Worker & Carrillo 1967, Carrillo et al. 1971, Döbereiner et al. 1971, Riet-Correa et al. 1975) e para cobaias (Camberos et al. 1970) intoxicados por SM. Esses mesmos sintomas também são reportados com frequência em casos de intoxicação por vitamina D (Stevenson et al. 1976, Chineme et al. 1976, Hascheck et al. 1978, Harrington & Page 1983, Gunther et al. 1988, Moore et al. 1988).

A diarreia tem sido descrita, mas não relacionada com as manifestações da intoxicação por outras plantas calcinogênicas como *Trisetum flavescens* (Dirksen et al. 1970, 1973) e *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1981). Lignières et al. (1912) ao descreverem a intoxicação espontânea por SM em bezerras, mencionam a ocorrência de uma enterite crônica, porém, Döbereiner et al. (1971) afirmam não ter visto sinais de diarreia. No presente estudo houve uma relação entre a ingestão do extrato aquoso de SM e a diarreia.

Calcificações no estômago foram descritas por Rossi et al. (1969) em coelhos dosificados com extrato aquoso de SM. Arnold & Bras (1956) descreveram o achado de depósitos calcáreos no abomaso e mesentério de animais afetados pela doença de Manchester e Barros et al. (1970) encontraram calcificações na muscular do omaso em ovinos afetados de calcinose enzoótica; estas lesões são semelhantes às descritas neste estudo.

Ao exame histológico do estômago, as porções mais afetadas foram as camadas musculares que mostravam alterações nos miócitos, microscópica e ultraestruturalmente, semelhantes às observadas nas células musculares

lisas da parede da aorta em coelhos intoxicados com SM (Rossi et al. 1969, Barros et al. 1981).

Tendo-se em conta que o princípio calcinogênico do SM é o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Wasserman et al. 1976) e que foram detectados receptores específicos para tal esteróide nas células musculares lisas da parede da aorta (Merke et al. 1987, Koh et al. 1988), sugere-se que as células musculares lisas do estômago devem possuir receptores semelhantes. Suportam esta teoria os achados de mineralizações no trato digestivo, em casos de intoxicação por vitamina D, em várias espécies, como as que ocorrem no abomaso de bovinos (Capen et al. 1966), na camada muscular e mucosa gástrica de coelhos (Stevenson et al. 1976), na mucosa gástrica de cavalos (Harrington & Page 1983) e no estômago de cães (Gunther et al. 1988). Dentro dessa linha de raciocínio, o princípio tóxico de SM, penetraria a membrana da célula muscular lisa do estômago e se combinaria com receptores específicos. Alguns dos complexos assim formados influenciariam a síntese protéica ao nível nuclear, ativando seqüências genéticas particulares e controlando os processos metabólicos celulares. Desta maneira, seriam afetadas a proliferação e a diferenciação celulares, eventos demonstrados *in vitro* para as células musculares lisas da aorta expostas ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Koh et al. 1988).

A variação na intensidade das alterações celulares e das calcificações pode ser devida ao fato de que os níveis do receptor podem influenciar a resposta celular ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou porque a quantidade do receptor contido numa determinada célula pode variar (Chen et al. 1982). É provável que ocorra uma regulação biológica dos receptores do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nos coelhos, igual à descrita para os ratos lactantes por Halloran & De Luca (1984), pois os animais jovens (45 dias de idade) deste experimento não apresentaram alterações.

A fusão de macrófagos para formar células gigantes multinucleadas poderia ser interpretada como uma resposta às calcificações extracelulares nas camadas musculares. Células gigantes similares foram observadas em casos de intoxicação por SM (Döbereiner et al. 1971, Riet-Correa et al. 1975, Barros et al. 1981) e pela vitamina D (Howerth 1983). Alternativamente, as células gigantes multinucleadas encontradas na mucosa estomacal podem ser o resultado da diferenciação de monócitos e sua fusão induzida pelo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, tal como tem sido comprovado *in vitro* (Bar-Shavit et al. 1983 e Abe et al. 1984). Uma sustentação para a teoria de que o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ contido em SM é o fator indutor da formação dessas células gigantes, é o fato de que elas aparecem em abundância na mucosa de estômagos que, até o momento, não tinham apresentado nenhum processo de calcificação. Em poucos casos foi possível evidenciar células gigantes com cristais de cálcio delimitados por membranas no seu interior. Na maioria das vezes, os cristais de cálcio parecem crescer dentro das células, ocupando grande parte do citoplasma, sem estar delimitados por membranas e, aparentemente, sem produzir grave dano celular. Em nosso

estudo não há evidências morfológicas de que estes cristais de cálcio sejam fagocitados, pelo contrário, parecem ser um produto endocelular primário. Também foram observados cristais de cálcio nas mitocôndrias destas células. As alterações mitocondriais aqui encontradas são similares às descritas por Kindblom & Guterberg (1988) em células gigantes tipo osteoclasto, observadas em calcinoses tumorais. Este processo de calcificação de tipo mitocondrial não parece estar ligado às concentrações extra-celulares de cálcio, nas intoxicações por SM em coelhos, pois as concentrações séricas nestes animais ao contrário dos bovinos (Sansom et al. 1971), sofrem apenas pequenas variações tal como demonstraram Basude & Humphreys (1975) e Santos et al. (1976).

Depósitos de cristais de cálcio foram vistos em associação a fragmentos celulares recobertos por membranas, semelhantes às vesículas matriciais (Anderson 1988) e a elementos da matriz extracelular, como foi descrito por Kingma & Roy (1988) nas calcificações arteriolares de ratos intoxicados com vitamina D.

Na aterosclerose humana verificou-se que as células musculares lisas degeneradas liberavam, por exocitose, vesículas extracelulares, as quais serviam como sítio inicial de deposição para os cristais de cálcio (Anderson 1988); as células musculares lisas do estômago, alteradas pelo 1,25(OH)₂D₃ talvez apresentem um comportamento semelhante. Sendo a matriz extracelular secretada pelas células locais e possuindo características que favorecem as calcificações patológicas (Chen 1988), é possível que o 1,25(OH)₂D₃ contido em SM, agindo sobre a síntese protéica (Laycock & Wise 1983), estimule as células musculares lisas alteradas a sintetizar e secretar novos elementos na matriz extracelular, facilitando a deposição de cristais de cálcio. Sugere-se que todas estas alterações sejam uma expressão fenotípica de uma transcrição de genes ativados pelo 1,25(OH)₂D₃.

O fato de não ter havido diferenças significativas na ação do extrato de SM administrado via sonda gástrica ou via endovenosa, demonstra que o princípio tóxico da planta não necessita passar pelo tubo digestivo para exercer sua ação sobre as diferentes células alvo, indicando que o conjugado intacto é ativo.

O edema na submucosa e na região foveolar da mucosa do estômago, foi encontrado com regularidade nos animais dosificados com SM. Alterações semelhantes foram associadas a uma prolongada azotemia em caninos (Cheville 1979), as quais foram atribuídas a dano capilar e a uma concentração de histamina na zona foveolar e do colo das glândulas gástricas. Este autor associa as altas concentrações de histamina na zona foveolar à presença de grande número de mastócitos, muitos deles em estado de degranulação, sendo encontrados grânulos livres no interstício. Não foi possível verificar tal mecanismo de indução de edema do estômago observado nos animais neste experimento. Também não foi verificada obstrução linfática, fato que ajudaria a explicar a presença de edema nas lesões.

Embora tenham sido observadas lesões em artérias da submucosa, não foi possível provar a presença de trombose. Usualmente, as alterações arteriais detectadas foram diminuindo em intensidade com a ramificação da árvore vascular.

A etiologia do edema permanece obscura; contudo, sugere-se que o princípio tóxico de SM agiria alterando a permeabilidade vascular diretamente ou através da liberação de mediadores a partir de células lesadas. Estas mudanças da permeabilidade vascular contribuiriam para a formação do edema da submucosa e da lâmina própria, bem como para a produção de focos hemorrágicos.

REFERÊNCIAS

- Abe E., Shiina Y., Miyaura K., Hyashi T., Janegasaki S., Saito M., Nishii Y., De Luca H.F. & Suda T. 1984. Activation and fusion induced by 1,25-dihydroxy vitamin D₃ and their relation in alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:7112-7116.
- Anderson H.C. 1988. Mechanisms of pathologic calcification. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 14:303-319.
- Arnold R. 1954. Manchester wasting disease. *West Indian Med. J.* 3:1-8.
- Arnold R.M. & Bras G. 1956. Observations on the morbid anatomy and histology of Manchester wasting disease of cattle in Jamaica, and related conditions in other countries of the Americas. *Am. J. Vet. Res.* 17:630-639.
- Bar-Shavit Z., Teitelbaum S.L., Reitsma F., Hall A., Pegg L.E., Trial J. & Kahn A.J. 1983. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5907-5911.
- Barros S., Pohlenz J. & Santiago C. 1970. Zür Kalzinose beim Schaf. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77:346-349.
- Barros S., Tabone E., Santos M., Andujar M. & Grimaud J.A. 1981. Histological and ultrastructural alterations in the aorta in experimental *Solanum malacoxylon* poisoning. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 35:169-175.
- Basude C.D.K. & Humphreys D.J. 1975. The effect of the active principle of *Solanum malacoxylon* on rabbits and inhibition of its action by actinomycin D. *Calcif. Tiss. Res.* 18:133-139.
- Camberos H.R., Davis G.K., Djafar M.I. Simpson C.F. 1970. Soft tissues calcification in guinea pigs fed the poisonous plant *Solanum malacoxylon*. *Am. J. Vet. Res.* 31:585-596.
- Capen C.C., Cole C.R. & Hibbs J.W. 1966. The pathology of hypervitaminosis D in cattle. *Path. Vet.* 3:350-378.
- Carrillo B.J., Tilley J.M., Garces N.N., Gaggino O.P., Ruksan B. & Worker, N.A. 1971. Intoxicación experimental de bovinos con *Solanum malacoxylon*. *Gac. Vet.*, 33:468-484.
- Castro, H.R. 1970. Enteeque seco, reproducción experimental en ovinos. *Rev. Med. Vet.* 51:131-136.
- Chen T.L., Cone C.M., Morey-Holton E. & Feldman, D. 1982. Glucocorticoid regulation of 1,25(OH)-vitamin D receptors in cultured mouse bone cells. *J. Biol. Chem.* 267:13564-135569.
- Chen, P.T. 1988. Pathologic calcium phosphate deposition in model systems. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 14:341-351.
- Cheville, N.F. 1979. Uremic gastropathy in the dog. *Vet. Pathol.* 16: 292-309.
- Chineme C.N., Krook L. & Pond W.G. 1976. Bone pathology in hypervitaminosis D, an experimental study in young pigs. *Cornell Vet.* 66:387-412.
- Collier W.A. 1927. Zür Kenntnis einer als Enteeque bezeichneten Krankheit der Rinder in der Provinz Buenos Aires. *Z. Infekt-Krankh. Parasit. Krankh. Hyg. Hst.* 31:81-92.
- Culling C.F.A., Allison R.T., Barr W.T. 1985. *Cellular Pathology Technique*. Cap. 26. Endocrine cells, p. 474-486. 4 ed. Butterworths, London.
- Dirksen G., Plank P., Hänichen T. & Spiess A. 1970. Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 79(4):77-79.

- Dirksen G., Plank P., Hänichen T. & Spiess A. 1973. Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 80(7):148-152.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Costa J.B.D., Campos, J.L.E. & Dayrell M.D.S. 1971. "Espichamento", intoxicação em bovinos por *Solanum malacoxylon*, no pantanal de Mato Grosso. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 6:91-117.
- Döbereiner J., Done S.H., Beltran L.E. 1975. Experimental *Solanum malacoxylon* poisoning in calves. Br. Vet. J. 131(2):175-185.
- Done S.H., Tokarnia C.H., Dämmrich K. & Döbereiner J. 1976. *Solanum malacoxylon* poisoning in pigs. Res. Vet. Sci. 20:217-219.
- Gunther R., Felice L.J., Nelson R.K. & Franson A.M. 1988. Toxicity of a vitamin D₃ rodenticide to dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193(2):211-214.
- Halloran B.P. & De Luca H.F. 1981. Appearance of intestinal cytosolic receptor for 1,25-Dihydroxyvitamin D during neonatal development in the rat. J. Biol. Chem. 256:7338-7342.
- Harrington D.D. & Page E.H. 1983. Acute vitamin D₃ toxicosis in horses: case reports and experimental studies of the comparative toxicity of vitamin D₂ and D₃. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182(12):1358-1369.
- Haschek W.M., Krook L., Kallfelz F.A. & Pond W.G. 1978. Vitamin D toxicity. Initial site and mode of action. Cornell Vet. 68:324-364.
- Howerth E.W. 1983. Fatal soft tissue calcification in suckling puppies. J. South Afr. Vet. Assoc. 54(1):21-24.
- Kindblom L.G. & Gunterberg B. 1988. Tumoral calcinosis, an ultrastructural analysis and consideration of pathogenesis. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 96(4):368-376.
- Kingma, J.G. & Roy, P.E. 1988. Ultrastructural study of hypervitaminosis D induced arterial calcification in Wistar rats. Artery 16(1):51-61.
- Koh E., Morimoto S., Fukuo K., Itoh K., Hironaka T., Shiraiashi T., Onashi T. & Kumamara Y. 1988. 1,25-Dihydroxy vitamin D₃ binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. Life Sci. 42(2):215-223.
- Krook L., Wassermann R.H., Shively, J.F., Tasmjian A.H., Brokken T.D. & Morton J.F. 1975. Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: implication of the shrub *Cestrum diurnum* as the causative agent. Cornell Vet. 65(1):26-56.
- Laycock J.F. & Wise P.H. 1983. Essential Endocrinology. 2nd ed. Oxford University Press. 371p.
- Lignieres J. 1912. Arterioesclerosis epidémica en el ovino. Revta Zootécnica 37:1-7.
- Merke J., Hofmann W., Goldschmidt D. & Ritz E. 1987. Demonstration of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ receptors and action in vascular smooth muscle cells in vitro. Calcif. Tiss. Int. 41:112-114.
- Moore F.M., Rudisch M., Richter K. & Faggella A. 1988. Hypercalcemia associated with rodenticide poisoning in three cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193(9):1099-1100.
- Morris K.M.L. 1982. Plant induced calcinosis: a review. Vet. Hum. Toxicol. 24(1):34-48.
- Noseda R.P., Cumba S.A., Gimeno E.J., Bandon J.C., Borrajo H., Maida J.C. & Forastieri H. 1976. Reproducción experimental de "enteque seco" por duraznillo blanco, su tratamiento y posterior estudio comparativo de animales tratados y no tratados. Gac. Vet. 38(309):105-112.
- Riet-Correa F., Riet-Correa I. & Bellagamba C. 1975. Calcificación metastática enzoótica (Enteque seco) en bovinos del Uruguay. Veterinaria 12(60):15-23.
- Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Santos E.C. & Scarsi R.M. 1981. Experimentos em coelhos sugerem *Nierembergia veitchii* como causa de calcinose enzoótica em ovinos no Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 16:727-732.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Wasserman, R. & Krook L. 1987. Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). Pesq. Vet. Bras. 7:85-95.
- Ross E., Simpson C.F., Rowland L.O. & Harms, R.H. 1971. Toxicity of *Solanum malacoxylon* to chicks. Poultry Sci. 50(3):870-873.
- Rossi F.M., Dallorso M.E., Daskal H.E., Gaggino O. & Leiva A. 1969. Reproducción experimental de enteque seco en conejo. I. Lesiones cardiovasculares. Gac. Vet. 31(230):415-426.
- Sansom B.F., Vagg, M.S. & Döbereiner J. 1971. The effects of *Solanum malacoxylon* on calcium metabolism in cattle. Res. Vet. Sci. 604-605.
- Santos M.N., Nunes V.A., Nunes I.J., Barros S., Wasserman R.H. & Krook L. 1976. *Solanum malacoxylon* toxicity: inhibition of bone resorption. Cornell Vet. 66(4):565-588.
- Stevenson R.G., Palmer N.C. & Finley G.G. 1976. Hypervitaminosis D in rabbits. Can. Vet. J. 17(2):54-57.
- Wassermann R.H. 1975. Active vitamin D-like substances in *Solanum malacoxylon* and other calcinogenic plants. Nutr. Rev. 33(1):1-5.
- Wassermann R.H., Corradino R.A. & Krook L.P. 1975. *Cestrum diurnum*: omestic plant with 1,25-dihydroxycholecalciferol-like activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62(1):85-91.
- Wasserman R.H., Henion J.D. & Haussler M.R. 1976. Calcinogenic factor in *Solanum malacoxylon*: Evidence that it is 1,25-dihydroxyvitamin D₃ glicoside. Science 199:853-854.
- Worker N.A. & Carrillo B.J. 1967. "Enteque seco", calcification and wasting in grazing animals in Argentina. Nature 215:72-74.