

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PATOGÊNESE DAS LESÕES
ASSOCIADAS À INTOXICAÇÃO POR
Ramaria flavo-brunnescens EM BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria Elisa Trost

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**PATOGÊNESE DAS LESÕES
ASSOCIADAS À INTOXICAÇÃO POR
Ramaria flavo-brunnescens EM BOVINOS**

por

Maria Elisa Trost

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^a. Glaucia Denise Kommers

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

T857p Trost, Maria Elisa, 1980-

 Patogênese das lesões associadas à intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos / por Maria Elisa Trost ; orientador Gláucia Denise Kommers. - Santa Maria, 2009.
 81 f. ; il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2009.

 1. Medicina veterinária 2. Bovinos 3. Doenças de bovinos 4. Intoxicação por cogumelo 5. *Ramaria flavo-brunnescens* 6. Defeito na ceratinização 7. Patologia veterinária I. Kommers, Gláucia Denise, orient. II. Título

 CDU: 619:636.2

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

C 2009

Todos os direitos autorais reservados a Maria Elisa Trost. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.
Endereço eletrônico: m_elisa_trost@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PATOGÊNESE DAS LESÕES
ASSOCIADAS À INTOXICAÇÃO POR
Ramaria flavo-brunnescens EM BOVINOS**

elaborada por
Maria Elisa Trost

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Glucia Denise Kommers, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Ana Lucia Pereira Schild, Dra. (UFPEL)

Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD (UFSM)

Santa Maria, 6 de fevereiro de 2009.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PATOGÊNESE DAS LESÕES ASSOCIADAS À INTOXICAÇÃO POR *Ramaria flavo-brunnescens* EM BOVINOS

AUTORA: MARIA ELISA TROST

ORIENTADORA: GLAUCIA DENISE KOMMERS

Data e local da defesa: Santa Maria, 6 de fevereiro de 2009

O estudo da patogênese da intoxicação pelo cogumelo *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos foi realizado através da avaliação retrospectiva de tecidos selecionados de nove casos espontâneos e quatro casos experimentais. Para a investigação da patogênese das lesões observadas na língua, esôfago, casco e cauda, foram avaliadas as alterações histopatológicas e aspectos histoquímicos e histoquímico-ultra-estruturais das lesões. As técnicas histoquímicas utilizadas foram o Tricrômico de Masson e a oxidação seletiva da ceratina (OSC). O estudo histoquímico-ultra-estrutural foi realizado através da técnica de Swift sob microscopia eletrônica de transmissão. Os pelos da vassoura da cauda foram examinados sob microscopia de luz polarizada. Nos tecidos examinados foram observados diferentes graus e estágios de lesões. Nos bovinos intoxicados espontaneamente as lesões foram mais acentuadas que nos casos experimentais. Na língua, a grande maioria das lesões histopatológicas observadas demonstrou defeitos na ceratinização como desaparecimento das papilas filiformes, adelgaçamento, estratificação irregular, ceratinização lamelar focal e ceratinização individual de células (discratose) no epitélio de revestimento dorsal. No esôfago observaram-se adelgaçamento do epitélio superficial e úlceras multifocais. Nos cascos havia alterações no estrato laminar, caracterizadas por graus variáveis de fusão, encurtamento, múltiplas camadas de células não-ceratinizadas no topo, ceratinização irregular e descontínua com persistência de núcleos, ceratinização individual e vacuolização citoplasmática de ceratinócitos das lâminas epidérmicas. Na pele da região da vassoura da cauda, as alterações foram divididas em lesões da parede folicular (nas bainhas radicular externa e interna) e alterações nos pelos propriamente ditos. As principais alterações observadas no epitélio folicular foram desorganização, desalinhamento e discratose de ceratinócitos da bainha radicular externa. Nas seções histológicas, as principais alterações nas hastes pilosas demonstraram contornos irregulares, tortuosidade e desintegração da haste. Alterações morfológicas semelhantes às descritas nas seções histológicas e alterações no padrão de birrefringência foram observadas através do exame polaroscópico dos pelos. Através da técnica do Tricrômico de Masson (com ácido pícrico) observou-se ceratinização dura defeituosa das papilas filiformes linguais, das lâminas epidérmicas do casco e dos pelos da cauda. A técnica da OSC revelou redução marcada do conteúdo de cistina, visualizado como fraca coloração rósea dessas mesmas estruturas. No estudo histoquímico-ultra-estrutural da cutícula pilosa, realizado através da técnica de Swift sob microscopia eletrônica de transmissão, observou-se também um baixo conteúdo de cistina. Todas as alterações observadas nas estruturas ceratinizadas estudadas, mas especialmente nas que sofrem ceratinização dura, revelaram defeitos na ceratinização. Aliando ao estudo morfológico os resultados obtidos através da técnica da OSC e da microscopia eletrônica/técnica de Swift pode-se associar os defeitos na ceratinização a uma redução na quantidade de aminoácidos sulfurados (cistina), principalmente nas estruturas que sofrem ceratinização dura, sendo este provavelmente o principal mecanismo patogênico na intoxicação por *R. flavo brunnescens* em bovinos.

Palavras-chave: doenças de bovinos; intoxicação por cogumelo; *Ramaria flavo-brunnescens*; defeitos na ceratinização; patologia veterinária.

ABSTRACT

MS Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PATOGENESIS OF LESIONS ASSOCIATED WITH POISONING BY *Ramaria flavo-brunnescens* IN CATTLE

AUTHOR: MARIA ELISA TROST
ADVISER: GLAUCIA DENISE KOMMERS
Santa Maria, February 6, 2009

The pathogenesis of the lesions of the *Ramaria flavo-brunnescens* poisoning in cattle was studied throughout a retrospective evaluation of selected tissues from nine spontaneous and four experimental cases of the disease. The pathogenesis of lesions observed in the tongue, esophagus, hoof, and tail was investigated analyzing microscopic lesions, histochemical and histochemical-ultrastructural changes. Histochemical techniques utilized were Masson's Trichrome and Selective Oxidation of Keratin (SOK). The histochemical-ultrastructural study was accomplished throughout the Swift method under transmission electron microscopy. Hair shafts of the tip of the tail were analyzed under polarized light. Lesions of varying degrees of severity were observed. They were more severe in spontaneous than in experimental cases. In the tongue, most microscopic lesions showed keratinization defects, such as loss of the filiform papillae, thinning, irregular stratification, focal lamellar keratinization, and individual cell keratinization (dyskeratosis) in the dorsal epithelium. In the esophagus, there were thinness of superficial epithelium and multifocal ulcers. In the hoof, lesions were in the laminar stratum and characterized by different grades of fusion, shortness, multiple layers of non-keratinized cells in the laminar tip, irregular and discontinuous keratinization with nuclear persistency, individual cell keratinization with cytoplasmic vacuolization of keratinocytes of the epidermal laminae. In the skin of the tip of the tail, changes could be separated in follicular wall lesions (affecting the outer [ORS] and the inner root sheets [IRS]) and changes of the hair shaft itself. The main changes observed in the follicular epithelium were disorganization, misalignment, and diskeratosis of keratinocytes of the ORS. On tissue sections, main changes in the hair shafts showed irregular contour, tortuousness, and disintegration of shaft. Morphological changes similar to the ones observed on tissue sections and changes in polarizing patterns were seen on polarized light microscopy of hair shafts. Tissue sections stained by Masson's Trichrome technique (with picric acid) revealed defective hard keratinization of filiform papillae, of epidermal lamina of hoof, and of tail tip hair shafts. Sections stained by the SOK technique revealed strong loss of cystine contents, visualized as light staining of these same structures. On the histochemical-ultrastructural study of the hair cuticle, performed throughout the Swift technique under transmission electron microscopy, a low content of cystine was also observed. All changes observed in the keratinized structures studied, mostly in the hard keratin, showed defective keratinization. The morphologic study and the results obtained with SOK and Swift techniques showed that the defective keratinization results of low amounts of sulphur containing amino acids (cystine) in hard keratin structures. This is probably the main pathogenetic mechanism of the lesions observed in *R. flavo brunnescens* poisoning in cattle.

Key words: cattle diseases; mushroom poisoning; *Ramaria flavo-brunnescens*; defective keratinization; veterinary pathology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural do aminoácido cisteína. Fonte: LENINGHER, 1978.	20
FIGURA 2 - Representação esquemática de uma ponte dissulfeto (S—S) entre duas cisteínas. Fonte: adaptado de LENINGHER, 1978.	20
FIGURA 3 – Rompimento oxidativo das ligações cruzadas dissulfeto por oxidação com ácido perfórmico. Fonte: adaptado de LEHNINGER, 1978.	23
FIGURA 4 – A) Corte sagital de dígito bovino mostrando a parede do casco (1), a sola (2), o periópio (3), as falanges média (4) e distal (5), o sesamóide distal (6) e os ligamentos flexor digital profundo (7) e extensor digital comum (8). B) Casco bovino; estrato médio. Observa-se que a ceratina tubular é formada por ceratinócitos arranjados ao redor de uma medula central clara (seta). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 40x. C) Casco bovino; estrato laminar. Observam-se lâminas epidérmicas (1), com ceratina laminar central (*), paralelas às lâminas dérmicas (2). HE, obj. 20x.	35
FIGURA 5 – A) Corte longitudinal da pele da cauda de um bovino mostrando pelo e folículo piloso em fase anágena. Observam-se as estruturas principais do pelo e do folículo piloso: papila dérmica (1); matriz pilosa (2); pelo (3); bainha radicular interna (BRI; 4); bainha radicular externa (BRE; 5). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Corte transversal da pele da cauda de um bovino. Observa-se um pelo (1), a BRI (2) e a BRE (3). HE, obj. 20x. C) Corte longitudinal de cauda bovina. Observam-se as células da camada cuticular do pelo orientadas em direção à ponta do pelo (1) e as células da camada cuticular do folículo piloso (2) orientadas em direção ao bulbo piloso. As células cuticulares pilosas e foliculares estão separadas por um espaço (*) que é um artefato do processamento histológico. Tricrômico de Masson (com ácido pícrico), obj. 40x. D) Cutícula da haste pilosa bovina. Há três células cuticulares, nas quais se observa a exocutícula (1) e a endocutícula (2). Na exocutícula observa-se a camada A (*). Microscopia eletrônica de transmissão, método de Swift, aumento de 30.000 x.	36

FIGURA 6 - Método de encaminhamento do casco bovino para obtenção de seções do estrato laminar. A) Corte transversal da ponta do dígito. A peça é fixada em um torno e o corte é efetuado com uso de serrote. B) Fatia de casco obtida através de corte transversal da ponta do casco. C) Identificação e separação do estrato laminar. D) Amostra da região laminar pronta para processamento.....	42
FIGURA 7 - Representação esquemática do crescimento dos pelos durante o experimento com demonstração da área de colheita de material para microscopia eletrônica (técnica de Swift).	43
FIGURA 8 – A) Espécimes de <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> encontradas no solo de bosque de eucalipto (propriedade onde ocorreu o surto B). B) Superfície dorsal, língua; Bovino 8. Observa-se que há uma área ulcerada e deprimida e que não há papilas filiformes. C) Esôfago; Bovino 5. A mucosa esofágica apresenta úlceras lineares multifocais. D) Cauda; Bovino 2. Há ausência de pelos da vassoura da cauda.	50
FIGURA 9 – Papila filiforme lingual. A) Papila normal, Bovino 10 (controle). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Papila atenuada, Bovino 6, HE, obj. 20x.	51
FIGURA 10 – Papila filiforme lingual. A) Papila normal, Bovino 10 (controle). Observa-se que a porção central da papila é corada de amarelo-brilhante, Tricrômico de Masson, obj. 20x. B) Papila atenuada, Bovino 6. A papila é menor, corada de amarelo menos intenso e há áreas centrais coradas em vermelho. Tricrômico de Masson (com ácido pícrico), obj. 20x. C) Papila degenerada, Bovino 13. Observa-se alteração na morfologia (vacuolização citoplasmática) e organização dos ceratinócitos da papila. Na área central, restam apenas pequenas áreas amarelo-claras, Tricrômico de Masson, obj. 20x.	51
FIGURA 11 – Papila filiforme lingual. A) Papila normal, Bovino 10 (controle). Observa-se que a papila é corada de rosa-forte, Oxidação seletiva da ceratina (OSC), obj. 20x. B) Resquício de papila, Bovino 8. Observa-se que permanece apenas o resquício da estrutura que é corada de rosa-claro, OSC, obj. 20x.	52
FIGURA 12– Superfície dorsal da língua. A) Observa-se área difusa de ulceração, Bovino 2, Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Tecido fibrovascular subjacente à região parcialmente ulcerada da superfície dorsal da língua, Bovino 9. Observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno (coradas em azul) e numerosos vasos neoformados (em vermelho), Tricrômico de Masson, obj. 40x. C) Epitélio dorsal, língua, Bovino 6. Observa-se área de re-epitelização caracterizada por um fino epitélio que recobre área de tecido fibrovascular, HE, obj. 4x.....	53

- FIGURA 13– Epitélio dorsal lingual, Bovino 6, Hematoxilina-eosina. A) Há projeções irregulares do epitélio para a lâmina própria com ninhos desconectados do epitélio (seta). Obj. 10x. B) Observa-se perda da orientação normal dos ceratinócitos e formações concêntricas. Obj. 40x. C) Formação de ceratina lamelar concêntrica. Obj. 20x. D) Observa-se ceratinócitos circundados por halo claro, com citoplasma fortemente eosinofílico e núcleo pequeno e hipercromático (seta). Obj. 40x.54
- FIGURA 14 – Epitélio esofágico. Hematoxilina-eosina (HE). A) Epitélio normal, Bovino 10 (controle). Obj. 20x. B) Redução expressiva da espessura epitelial, Bovino 6. Obj. 20x. C) Ulceração acentuada, Bovino 4. Obj. 40x. D) Epitélio (re-epitelização) recobrimdo área de tecido fibrovascular, Bovino 5. Obj.40x. E) Projeções irregulares do epitélio para a lâmina própria, Bovino 3. Obj. 20x. F) Epitélio com ceratinócitos com morfologia alterada e vacuolização subcorneal, Bovino 6. Obj. 40x.55
- FIGURA 15 – Região laminar do casco. Hematoxilina-eosina (HE). A) Casco normal, Bovino 11 (controle). Obj. 20 x. B) Fusão do topo das lâminas epidérmicas, Bovino 6. Obj. 10x. C) Encurtamento (*) e maior número de camadas de células não-ceratinizadas no topo das lâminas (seta), Bovino 4. Obj. 20x. D) Vacuolização de ceratinócitos e acúmulos intracitoplasmáticos eosinofílicos (seta), Bovino 6. Obj. 40x.56
- FIGURA 16 – Região laminar do casco. Hematoxilina-eosina (HE). A) Casco normal com ceratinização laminar central homogênea, Bovino 11 (controle). Obj. 10x. B) Desorganização na disposição dos ceratinócitos no epitélio laminar. Há várias camadas de ceratinócitos, muitos deles vacuolizados, ausência da ceratinização ab-rupta do centro da lâmina e persistência de núcleos na ceratina laminar (seta), Bovino 1. Obj. 20x. C) Ceratinização individual de células (seta), Bovino 5. Obj. 40x.57
- FIGURA 17– Região laminar do casco. Tricrômico de Masson. A) Epitélio laminar normal, Bovino 11 (controle). Observa-se a ceratina laminar contínua corada em amarelo. Obj. 20x. B) Fragmentos de ceratina laminar são observados em amarelo, Bovino, 1. Obj. 20x.58
- FIGURA 18 – Região laminar do casco. Técnica da oxidação seletiva da ceratina (OSC). A) Ceratina laminar normal, Bovino 11 (controle). A ceratina é corada homogêneamente de rosa-forte. Obj. 20x. B) Ceratina laminar defeituosa, Bovino 5. A ceratina é corada de rosa-claro. Obj. 20x.59
- FIGURA 19 – Folículos pilosos da pele da região da vassoura da cauda. A) Folículo piloso e pelo normais, Bovino 12 (controle). Hematoxilina-eosina (HE), obj 20x. B) Folículo piloso com contornos internos e externos irregulares, Bovino 9. HE Obj. 20x. C) Há desorganização das células da bainha radicular externa e espessamento da bainha radicular fibrosa (seta),

- Bovino 9. Tricrômico de Masson, obj. 20x. D) Espessamento da bainha radicular externa. Há numerosos ceratinócitos disceratóticos (seta) na bainha radicular externa e haste pilosa desintegrada na área central, Bovino 9. HE, Obj 20x..... 60
- FIGURA 20 – Folículos pilosos da pele da região da vassoura da cauda. Hematoxilina-eosina (HE). A) Folículo piloso e pelo normais, Bovino 12 (controle). Obj. 10x. B) Folículo com bainha radicular interna (BRI) desintegrada. Há um pelo degenerado no centro do folículo (seta), Bovino 1. Obj. 20x. C) BRI de folículo piloso normal em maior detalhe, Bovino 12 (controle). Obj. 40x. D) BRI degenerada (seta) e desprendimento da bainha radicular externa, Bovino 1. Obj. 40x. 61
- FIGURA 21 – Pelos da pele da região da vassoura da cauda. A) Folículo piloso e pelo normais, Bovino 12 (controle). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Pelo com contorno irregular, Bovino 13. HE, obj. 20x. C, D e E) Pelos com contornos irregulares, extremamente tortuosos e desintegrados, Bovino 8, HE, obj. 40x, 20x e 20x respectivamente. F) Alteração pilosa acentuada. Apenas um pequeno fragmento de pelo degenerado está corado em amarelo. Tricrômico de Masson, obj. 40x. 62
- FIGURA 22 – Folículos pilosos e pelos da pele da região da vassoura da cauda. Técnica da oxidação seletiva da ceratina (OSC). A) Corte longitudinal de pelo normal, Bovino 12 (controle). O pelo é homogeneamente corado de rosa-forte. Obj. 20x. B) Corte longitudinal de pelo, Bovino 8. O pelo é degenerado e apenas algumas porções são coradas de rosa-claro. Obj, 20x. C) Corte transversal de pelo normal, Bovino 12 (controle). O pelo é homogeneamente corado de rosa-forte. Obj, 40x. Corte transversal de pelo, Bovino 8. Há restos de pelo corados de rosa claro. Obj. 20x. 63
- FIGURA 23 – Alterações nas hastes pilosas de bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens*. Exame polaroscópico. Obj. 20x. A) Haste pilosa normal do Bovino 16 no dia 0. Observa-se que a haste tem contornos e diâmetro regulares; além disso, há uma variação gradual nas cores. B) Haste pilosa com área achatada sem polarização. Bovino 7. C) Haste pilosa tortuosa e ondulada. Bovino 16, dia 5. D) Haste pilosa com torção longitudinal do eixo. Bovino 16, dia 5. E) Haste pilosa com polarização irregular; nota-se um segmento escuro e opaco. Bovino 16, dia 10. F) Haste pilosa com polarização ausente em segmento extenso. Bovino 16, dia 10.... 64
- FIGURA 24 - Fotomicrografia eletrônica das células cuticulares pilosas dos pelos da vassoura da cauda do Bovino 16 intoxicado experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens*. A) Dia 0. As células cuticulares não apresentam alterações. Aumento de 30.000 x. B) Dia 15. Observa-se acentuada irregularidade da exocutícula (cabeça de seta), com inclusões cistina-positivas, arredondadas ou irregulares (seta) na endocutícula. Aumento de 37.500 x..... 65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados de resenha dos bovinos e parâmetros avaliados em tecidos selecionados dos casos de intoxicação espontânea por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i>	38
TABELA 2 – Dados de resenha dos bovinos e parâmetros avaliados em tecidos selecionados dos casos de intoxicação experimental por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i>	38
TABELA 3 – Principais alterações histopatológicas observadas na língua dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i>	44
TABELA 4 – Principais alterações histopatológicas observadas no esôfago dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i>	46
TABELA 5 – Principais alterações histopatológicas observadas no casco dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i>	47
TABELA 6 – Principais alterações histopatológicas observadas nos pelos e folículos pilosos dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i>	48

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Oxidação seletiva da ceratina (OSC) solução oxidante de ácido peracético	80
APÊNDICE B – Técnica de Swift (1967) para demonstração de cisteína em seções transversais de pelo.....	81
APÊNDICE C - Reagente metenamina-nitrato de prata	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Intoxicação por <i>Ramaria flavo-brunnescens</i> em bovinos	15
2.2 Processo de ceratinização.....	18
2.2.1 Ceratinização normal.....	18
2.2.2 Ceratinização defeituosa.....	23
2.2.2.1 Intoxicação crônica por selênio em bovinos.....	24
2.2.2.2 Tricotiodistrofia (TTD).....	25
2.2.2.3 <i>Pili torti</i>	26
2.2.2.4 Outras alterações pilosas associadas a defeitos na ceratinização em humanos.....	27
2.3 Aspectos histológicos dos tecidos estudados.....	28
2.3.1 Língua.....	28
2.3.2 Esôfago	29
2.3.3. Casco	29
2.3.4 Folículos pilosos e pelos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Amostras.....	37
3.2 Estudo morfológico.....	37
3.3 Estudo histoquímico	39
3.3.1 Método de oxidação seletiva para a demonstração de ceratina (OSC):	39
3.3.2 Tricrômico de Masson.....	40
3.3.3 Estudo histoquímico-ultra-estrutural	40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Resultados.....	44
4.2 Discussão.....	66
5 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos é atribuída ao consumo do cogumelo fresco e altamente palatável encontrado no solo de bosques de eucalipto (SANTOS et al., 1975). Na forma espontânea da intoxicação, os bovinos apresentam emagrecimento, sialorréia, e alisamento e ulceração da superfície dorsal da língua. Os pelos longos da vassoura da cauda se soltam facilmente quando tracionados (BARROS et al., 2006). Pode haver hiperemia do rodete coronário e os animais relutam em se mover, ficando em decúbito. Há hiperemia da conjuntiva ocular, hifema e opacidade da córnea. Alguns animais perdem o revestimento córneo dos cascos, dedos acessórios e chifres (SANTOS, 1993). Lesões semelhantes têm sido descritas nos casos experimentais (SANTOS et al., 1975; KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007)

As principais lesões envolvem epitélios e especialmente estruturas que sofrem algum grau de ceratinização dura como papilas filiformes da língua, pelos (principalmente da vassoura da cauda) e o estrato laminar do casco (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007).

O princípio tóxico de *R. flavo-brunnescens*, não é totalmente conhecido até o presente momento (TOKARNIA et al., 2000). Há duas hipóteses para a patogênese das lesões observadas em bovinos (KOMMERS; SANTOS, 1995) e em ovinos (SALLIS et al., 2000). A hipótese proposta para bovinos é de que o princípio tóxico interfira no metabolismo dos aminoácidos sulfurados nos ceratinócitos, principalmente da cistina, resultando no enfraquecimento da estrutura molecular da ceratina dura por deficiência de enxofre (KOMMERS; SANTOS, 1995). O mecanismo proposto para os ovinos é de que ocorram lesões vasculares e isquêmicas, semelhantes às do ergotismo (SALLIS et al., 2000).

Neste estudo de patogênese, que avalia simultaneamente casos espontâneos e experimentais da intoxicação pelo cogumelo em bovinos, teve-se o objetivo de analisar detalhadamente as alterações morfológicas observadas na língua, esôfago, casco e cauda e avaliar através de técnicas histoquímicas e histoquímico-ultra-estruturais as alterações nas propriedades estruturais e químicas da ceratina dura nos tecido lesados, a fim confirmar ou não o mecanismo patogenético proposto para a intoxicação de bovinos por *R. flavo-brunnescens*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos

Ramaria flavo-brunnescens é um cogumelo pertencente à família *Clavariaceae* que cresce em solos de bosques de eucalipto (TOKARNIA, 2000; RIET-CORREA ; MÉNDEZ, 2007). No Brasil é encontrado nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Também foi identificado em países como Uruguai, Argentina, Paraguai, Estados Unidos, China, Índia e Austrália (FIDALGO; FIDALGO, 1970; NAUDÉ; BERRY, 1997).

O cogumelo cresce em colônias numerosas e pode alcançar 11 cm de altura, é amarelo-claro ou alaranjado, semelhante à couve-flor. É extremamente palatável, sendo, inclusive, consumido por humanos após cocção (FIDALGO; FIDALGO, 1970). A ingestão espontânea do cogumelo causa intoxicação em bovinos e ovinos e menos frequentemente em equinos e suínos (BARROS, 2005). A intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* foi suspeitada em bubalinos (ROZZA et al., 2004). Embora talvez seja mesmo possível os bubalinos se intoxicarem, a ocorrência de casos subsequentes aos descritos por Rozza et al. (2004) porém na ausência do cogumelo, levam a crer que as lesões descritas na época teriam outra causa (DRIEMEIER, 2008*).

Fatores como a alta palatabilidade do cogumelo, o acesso dos animais a bosques de eucalipto, bem como o uso desses bosques como abrigo predispõe à intoxicação (SANTOS, 1993). No Sul do Brasil, os surtos ocorrem nos meses de outono, época que coincide com o ciclo natural do cogumelo (KOMMERS, 1993; SANTOS, 1993; BARROS et al., 2006).

O princípio tóxico de *R. flavo-brunnescens* é desconhecido (TOKARNIA et al., 2000). Na década de 60, pesquisadores isolaram um alcaloide volátil e termolábil de amostras frescas do cogumelo e do fígado de um bovino intoxicado (BAUER et al., 1966). O princípio tóxico também foi atribuído a um glicosídeo (FREITAS et al., 1966), no entanto pesquisas adicionais não foram realizadas. Fidalgo & Fidalgo (1970) afirmam que *in natura* o princípio tóxico é muito perigoso e tem efeito acumulativo. Resultados de estudos experimentais indicam

* David Driemeier. Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (comunicação pessoal).

claramente que a toxicidade é perdida quando o cogumelo é dessecado (SALLIS et al., 2004) ou cozido (FIDALGO; FIDALGO, 1970) e diminui bastante quando este é congelado (KOMMERS, 1993; SALLIS et al., 2004).

Em bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* a taxa de morbidade pode chegar a 80% e a mortalidade a 50% (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007). O consumo de 5 g/kg/dia do cogumelo fresco durante cinco dias é suficiente para que os bovinos demonstrem sinais clínicos (SANTOS et al., 1975).

Na forma espontânea da intoxicação, os bovinos apresentam emagrecimento, sialorréia, e alisamento da superfície dorsal da língua, que em muitos casos tem úlceras (BARROS et al., 2006). Os pelos longos da cauda e do dorso e lombo se soltam facilmente quando tracionados. Muitas vezes há hiperemia do rodete coronário e os animais relutam em se mover, ficando deitados. Em alguns casos há dermatite, principalmente nas áreas brancas da pele, edemas subcutâneos do peito e dos membros, hiperemia da conjuntiva ocular, hifema e opacidade da córnea. Alguns animais perdem o revestimento córneo dos cascos, dedos acessórios e chifres (SANTOS, 1993).

Na intoxicação experimental, os sinais clínicos são menos intensos (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007) que na espontânea (BARROS et al., 2006). Ocorre apatia, anorexia, emagrecimento, salivação, hiperemia da mucosa oral, alisamento da superfície dorsal da língua e queda dos pelos longos da vassoura da cauda quando levemente tracionados (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007). Em alguns bovinos há hiperemia e aumento da sensibilidade da região coronária dos cascos, perda do revestimento córneo dos chifres, perda de pelos do dorso, descarga nasal serosa, diminuição dos movimentos ruminais e diarreia (KOMMERS; SANTOS 1995). Corrimento seroso ocular e desidratação também foram descritos (SANTOS et al., 1975).

Os achados macroscópicos nos bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* são característicos e correspondem aos sinais clínicos apresentados. A língua apresenta a superfície dorsal lisa, com atrofia das papilas filiformes e em alguns casos com desprendimento do epitélio lingual, que é recoberto por fibrina (BARROS et al., 2006). Ocorre afrouxamento e perda dos pelos principalmente da extremidade da cauda, e nos casos graves, afrouxamento e desprendimento dos cascos e chifres (SANTOS, 1993).

Alterações menos frequentes incluem erosões e ulcerações lineares na mucosa esofágica, muitas vezes recobertas por exsudato fibrinonecrótico e avermelhamento e ulcerações na mucosa do abomaso (SANTOS, 1993). Alguns bovinos podem apresentar abundante quantidade de líquido cefalorraquidiano à abertura do crânio e as leptomeninges do

encéfalo hiperêmicas. Os olhos dos bovinos intoxicados podem apresentar hifema, hipópion e opacidade da córnea (BARROS et al., 2006).

Quanto às alterações microscópicas, na cauda as lesões se caracterizam por hiperkeratose ortoceratótica da epiderme. Nos folículos pilosos da derme superficial há formação de uma espessa camada de ceratina triquilêmica (tricolemal) e são vistas poucas hastes de pelos nos folículos, que apresentam contorno irregular. Os folículos pilosos da derme profunda apresentam intensa vacuolização dos ceratinócitos da parede, degeneração e necrose da bainha radicular externa e entre os folículos pilosos mais afetados há infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos (BARROS et al., 2006).

As lesões observadas na língua se caracterizam por atrofia ou ausência das papilas filiformes, áreas focais de disceratose e áreas de espongiose da camada de células basais. No casco observam-se fusão e encurtamento de lâminas epidérmicas, hiperplasia leve no topo das lâminas epidérmicas com queratinização irregular e permanência dos núcleos. O esôfago pode apresentar graus variados de necrose epitelial e inflamação, que também podem ser observadas no abomaso. É descrita malacia focal simétrica no bulbo (BARROS et al., 2006). Nos olhos há hemorragia nas câmaras anterior e posterior, reação inflamatória linfocítica e hemorragia da íris (SANTOS, 1993).

A patogênese da intoxicação por *R. flavo-brunnescens* tem sido investigada principalmente através de estudos experimentais em bovinos (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007) e ovinos (SALLIS et al., 2000, 2004).

Nos estudos experimentais realizados em bovinos foi proposto que as lesões observadas envolvem especialmente epitélios que sofrem algum grau de ceratinização dura, onde há alta concentração de aminoácidos sulfurados. Acredita-se que ocorra algum tipo de interferência no metabolismo dos aminoácidos sulfurados nos ceratinócitos, principalmente da cistina, levando ao enfraquecimento da estrutura molecular da ceratina dura (KOMMERS, 1993).

Essa hipótese parece bastante razoável quando se compara as lesões tegumentares encontradas em bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* com as lesões da intoxicação crônica por selênio em bovinos (O'TOOLE; RAISBECK, 1995). Nessa doença, também conhecida como *alkali disease*, é proposto que, devido à semelhança entre os elementos selênio e enxofre, ocorra a substituição do enxofre pelo selênio nos resíduos de cisteína (que formariam uma molécula de cistina) das proteínas com alto teor de enxofre, levando a um afrouxamento das ligações cruzadas das pontes dissulfeto nos ceratinócitos (O'TOOLE; RAISBECK, 1995).

Vale salientar que as semelhanças entre a intoxicação por *R. flavo-brunnescens* e a selenose crônica em animais domésticos não estão restritas às alterações epiteliais, visto que as alterações descritas no bulbo (malacia focal simétrica) de bovinos intoxicados espontaneamente pelo cogumelo (BARROS et al. 2006) assemelham-se às descritas na medula espinhal na selenose em suínos (CASTEEL et al., 1985).

Em um estudo experimental de intoxicação em ovinos, sugeriu-se que as lesões causadas por *R. flavo-brunnescens* decorriam da ação de uma substância vasoconstritora, semelhante aos ergocalcoides causadores do ergotismo (SALLIS et al., 2000). Essa substância presente no cogumelo estimularia persistentemente a musculatura lisa de arteríolas, provocando assim um espessamento da camada média (denominado miopaquinse). Como consequência ocorreria vasoconstrição, necrose coagulativa e ulceração do epitélio irrigado por esses vasos (SALLIS et al., 1993). No entanto, a ausência de miopaquinse nos vasos dos bovinos intoxicados pelo cogumelo (KOMMERS; SANTOS, 1995; BARROS et al., 2006; SCHONS et al. 2007), sugere que esse não seja o mecanismo patogênico da intoxicação por *R. flavo-brunnescens* nessa espécie animal. Em estudos experimentais foi constatado que o cogumelo dessecado perde a toxicidade e ocorre uma diminuição da toxicidade quando congelado. Essa labilidade do princípio ativo de *R. flavo-brunnescens* não se observa nos ergocalcoides (SALLIS et al., 2004).

Com exceção de um estudo em que foram utilizadas as técnicas de imuno-histoquímica e de microscopia eletrônica de transmissão (SCHONS et al., 2007), os demais estudos experimentais da intoxicação de bovinos por *R. flavo-brunnescens* avaliaram as alterações morfológicas somente através da coloração de rotina (SANTOS et al., 1975; KOMMERS; SANTOS, 1995). A técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada em um estudo de casos espontâneos (BARROS, 2005).

2.2 Processo de ceratinização

2.2.1 Ceratinização normal

Considerando que as alterações observadas nos casos de intoxicação de bovinos por *Ramaria flavo-brunnescens* envolvem principalmente epitélios que sofrem algum grau de

ceratinização dura, torna-se importante revisar alguns aspectos da ceratinização fisiológica e assim identificar e compreender as alterações neste processo.

A ceratinização é uma das funções metabólicas mais importantes da epiderme (VAN SCOTT; FLESCHE, 1954). Para o observador casual, a ceratinização é considerada um processo puramente degenerativo e a ceratina simplesmente se origina de células epiteliais degeneradas, desidratadas e mortas. Da mesma forma, a ceratina ao longo do tempo, foi mal interpretada por muitos como uma substância simples e única, quando na verdade deveria ser vista como uma mistura complexa de proteínas filamentosas e amorfas (MATOLTSY, 1976; TOMLINSON et al., 2004).

As α -ceratinas são proteínas ricas em resíduos de cistina e pontes dissulfeto encontradas em diversos tecidos de mamíferos e classificadas em ceratina mole e dura (LEHNINGER, 1978; MARSHALL et al., 1991). Os termos dura e mole não designam apenas sensações táteis, mas abrangem também marcadas diferenças relacionadas às propriedades físicas e ao metabolismo de enxofre nesses dois tipos de ceratinas (EKFALCK et al., 1990; TOMLINSON et al., 2004).

Ceratina mole é encontrada na epiderme e em membranas mucosas ceratinizadas, enquanto a ceratina dura é encontrada em anexos (lã e pelos) e apêndices cutâneos como unhas, garras, cascos e chifres (VAN SCOTT; FLESCHE, 1954; BANKS, 1991; MARSHALL et al., 1991), bem como nas papilas filiformes da língua de algumas espécies animais, incluindo bovinos (BANKS, 1991). Com relação às propriedades físicas, a ceratina mole descama continuamente e fragmenta-se facilmente. A ceratina dura forma estruturas rígidas que não descamam (VAN SCOTT; FLESCHE, 1954). A ceratina formada no processo de ceratinização dura tem grande resistência e contém mais enxofre, principalmente na forma de cistina que a ceratina mole (EKFALCK, 1990; TOMLINSON et al., 2004).

A porção filamentosa da α -ceratina é formada por cadeias polipeptídicas helicoidais e paralelas, ordenadas em feixes denominados filamentos intermediários (FI), embebidos em uma matriz protéica não-filamentosa rica em enxofre (LENINGHER, 1978; MARSHALL et al., 1991).

As cadeias polipeptídicas de ceratina têm resíduos do aminoácido cisteína com grupamentos sulfidril ($-SH$) livres (Figura 1) (MATOLTSY, 1976; ELLIOTT; ELLIOTT, 1997). Durante a ceratinização ocorre a oxidação desses grupamentos $-SH$ e a formação de ligações covalentes fortes entre dois grupamentos $-SH$, conhecidas como pontes dissulfeto ou $S-S$ (Figura 2) (VAN SCOTT; FLESCHE, 1954; MATOLTSY, 1976). A formação das pontes $S-S$ é considerada o evento mais importante da ceratinização e a estrutura

tridimensional estabilizada por elas é responsável diretamente pela força mecânica, propriedades elásticas e resistência química e biológica da ceratina (VAN SCOTT; FLESCHE, 1954; MATOLTSY, 1976; MARSHALL et al., 1991)

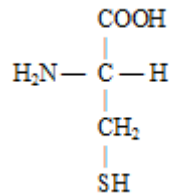


Figura 1 - Fórmula estrutural do aminoácido cisteína. Fonte: LENINGHER, 1978.

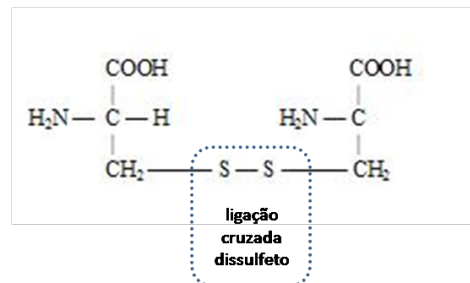


Figura 2 - Representação esquemática de uma ponte dissulfeto (S—S) entre duas cisteínas. Fonte: adaptado de LENINGHER, 1978.

A matriz protéica interfibrilar (uma substância densa e amorfa) na qual os filamentos de ceratina estão embebidos, contém cerca de 10 vezes mais enxofre que o componente filamentoso da célula e é responsável pela formação da maioria das pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas da ceratina (MATOLTSY, 1976). A proteína homogênea rica em cistina é encontrada em todas as ceratinas duras (MARSHALL et al., 1991).

Os filamentos de ceratina são responsáveis pela flexibilidade e elasticidade da camada córnea (MATOLSTY, 1976) e tem função estrutural (TOMLINSON et al., 2004), enquanto a matriz protéica associada aos filamentos é responsável pelo alinhamento, estabilização adequada desses filamentos no citoplasma da célula e pela maior parte da resistência da ceratina (MATOLTSY, 1976; TOMLINSON et al., 2004).

Além da matriz protéica associada aos filamentos de ceratina, a membrana celular do ceratinócito também tem papel importante na resistência da ceratina. É uma estrutura insolúvel, espessa e rica em enxofre que forma uma espécie de “exoesqueleto” rígido ao redor

do ceratinócito e confere ao estrato córneo como um todo grande estabilidade física e química (MEYER et al., 2005).

Durante o processo de ceratinização há substituição progressiva e contínua da maioria do conteúdo dos ceratinócitos por polipeptídeos de ceratina. A organização desses polipeptídeos em tonofilamentos e a formação de uma malha estrutural altamente insolúvel num arranjo aleatório (em duas ou três dimensões) imersa em uma matriz protéica não-filamentosa (MATOLTSY, 1976; PRICE et al., 1980; WEEDON, 2002, NORLÉN, 2004).

Na epiderme, as células do estrato basal (BANKS, 1991) são as únicas com potencial de replicação. Análises do ciclo celular revelam que a cist(e)ina estimula a proliferação celular em várias células (promove a progressão celular da fase G1 para a S) (BOURNE, 1960; NODA et al., 2002).

As células do estrato basal têm baixa densidade de filamentos e, à medida que se movem em direção ao estrato córneo, têm seu conteúdo de tonofilamentos aumentado drasticamente. O conteúdo de tonofilamentos continua a aumentar a taxas rápidas nas células do estrato espinhoso quando então têm início uma série de alterações morfológicas que transformam os ceratinócitos em células alargadas e depois achatadas (TOMLINSON et al., 2004).

Também se tornam aparentes os grânulos de cerato-hialina que, na fase final do processo de ceratinização, se dissolvem e formam a matriz na qual os filamentos de ceratina estão imersos. Estruturas lamelares denominadas de cementossomos ou ceratinossomos estão presentes no citoplasma das células do terço superior do estrato espinhoso (TOMLINSON et al., 2004). Essas estruturas liberam seu conteúdo no meio intercelular e formam uma substância PAS-positiva que atua unindo os ceratinócitos (MATOLTSY, 1976; TOMLINSON et al., 2004).

À medida que as células se movem para as camadas mais externas, há uma transição abrupta para células típicas do estrato córneo, o que envolve o preenchimento do citoplasma por ceratina e o desaparecimento do núcleo e de virtualmente qualquer organela citoplasmática e conteúdo. Esse é o estágio terminal da diferenciação epidérmica e agregação de filamentos de ceratina, quando ocorre a formação de ligações intermoleculares e os ceratinócitos morrem (TOMLINSON et al., 2004).

A ceratinização pode ser resumida como um processo de síntese, agregação e estabilização da proteína ceratina e síntese e exocitose da substância intercelular cimentante. O processo da ceratinização foi comparado à construção de uma parede de tijolos, onde os

ceratinócitos são os tijolos e a substância intercelular cimentante, o cimento (TOMLINSON et al., 2004).

Pode-se concluir que a flexibilidade e elasticidade da camada córnea protetora é garantida por proteínas filamentosas (relativamente pobres em enxofre quando comparadas as proteínas da matriz) e sua estabilidade por proteínas amorfas ricas em enxofre e essa integridade é criticamente governada pela espessura da membrana celular (MATOLTSY, 1976).

A ceratina pode ser detectada em seções histológicas através de técnicas histoquímicas específicas. Na detecção histoquímica da ceratina, as pontes dissulfeto da cistina são especialmente reativas à oxidação por diferentes reagentes como ácido perfórmico (LEHNINGER, 1978) e ácido peracético (Figura 3), uma técnica denominada de oxidação seletiva da ceratina (OSC) (PEARSE, 1951). Quando o ácido peracético (uma mistura de peróxido de hidrogênio e ácido acético mais estável que o ácido perfórmico) é utilizado como agente oxidante, o peróxido de hidrogênio oxida a cistina (PEARSE, 1951; LILLIE; BANGLE, 1954). O produto desta reação dá origem ao ácido cistéico que desenvolve a cor rosa-forte quando o reagente de Schiff é adicionado (PEARSE, 1951). Nas estruturas formadas por ceratina dura (como a haste pilosa, por exemplo) nas quais há grande quantidade de cistina a reação intensa é traduzida pela cor rosa-forte que é desenvolvida. Já, nas estruturas com menor quantidade de cistina e nas quais o enxofre existe principalmente na forma de cisteína (epiderme, por exemplo) a reação é fraca e a cor resultante é rosa-claro (PEARSE, 1951).

Além do método da OSC, a técnica do Tricrômico de Masson pode ser utilizada para a demonstração de ceratina, geralmente corando-a de vermelho (BEHMER et al., 1976; PROPHET et al., 1992). Devido às suas propriedades, a ceratina reage com algumas substâncias químicas. As substâncias córneas são ricas em aminoácidos redutores, especialmente o triptofano, a tirosina e a cistina. De acordo com o princípio de que as substâncias redutoras tem uma afinidade toda especial para um forte oxidante, as substâncias córneas (cornificadas) demonstram uma afinidade particular pelo ácido pícrico (FERNANDES, 1949) que é amarelo.

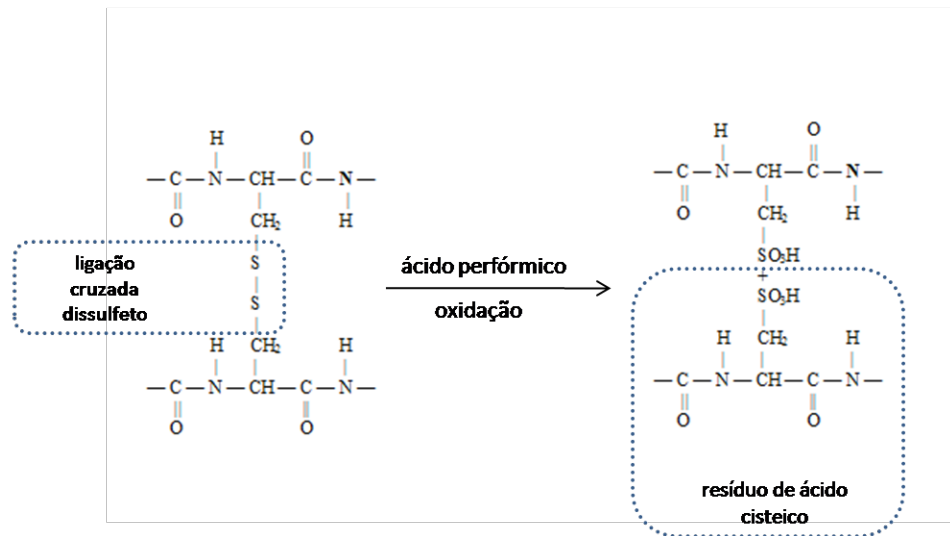


Figura 3 – Rompimento oxidativo das ligações cruzadas dissulfeto por oxidação com ácido perfórmico. Fonte: adaptado de LEHNINGER, 1978.

A microscopia de luz polarizada é usada para examinar substâncias orgânicas e inorgânicas rígidas e conspícuas como cristais de urato, amilóide, ésteres de colesterol, hastes pilosas, ceratina, tonofibrilas, sílica e certos corpos estranhos (WOLMAN, 1975; SPERLING & DiGIOVANNA, 2003; VALENTE et al., 2006; DONGRE et al., 2007). A ceratina é uma repetição seqüencial de proteínas cristalinas que tem a capacidade de retardar a onda de luz polarizada que a atravessa. Dessa forma, o cabelo aparece como um objeto luminoso e colorido contra um fundo preto (MARLIANI et al., 1997). Em geral a microscopia de luz e de luz polarizada das hastes pilosas conferem importantes pistas para o diagnóstico de defeitos isolados da haste ou síndromes complexas (ITIN; FISTAROL, 2005).

2.2.2 Ceratinização defeituosa

Alterações como hiperplasia ou atrofia, ceratose, paraceratose, estratificação irregular ou distúrbios na polarização das células, bem como ceratinização individual ou de pequenos grupos celulares e redução da coesão epitelial, são atribuídos a distúrbios da maturação de células epiteliais da mucosa oral em humanos, podendo muitas vezes preceder alterações neoplásicas (MORGAN, 1992). De forma semelhante, a presença de grande número de ceratinócitos disceratóticos, que aparecem como células arredondadas, circundadas por um

halo claro, com citoplasma fortemente eosinofílico e núcleo pequeno e hiper cromático, são associadas muitas vezes a defeito na diferenciação epitelial (YAGER; WILCOCK, 1994).

Nesta seção serão revisadas doenças e alterações nas quais há ceratinização defeituosa em estruturas ceratinizadas similares às observadas na intoxicação por *R. flavo-brunnescens* (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007). As referidas condições são a intoxicação crônica por selênio em bovinos (O'TOOLE; RAISBEK, 1995) e alterações relacionadas aos pelos como a tricotiodistrofia (ITIN et al., 2001), *pili torti* (MARUYAMA et al., 1994) entre outras alterações (MASAAKI, et al. 1984; MARUYAMA et al., 1994; WEEDON, 2002; WHITING; DY, 2006) que ocorrem nas hastes pilosas em humanos.

2.2.2.1 Intoxicação crônica por selênio em bovinos

A forma crônica da intoxicação por selênio também é denominada de *alkali disease* (AD) e é relatada em bovinos desde 1930 (O'TOOLE; RAISBECK, 1995). A intoxicação cursa com quadro crônico de emaciação associada a lesões significativas confinadas ao sistema tegumentar (O'TOOLE; RAISBECK, 1995; NÉSPOLI et al., 2001).

Os bovinos intoxicados cronicamente por selênio apresentam rachaduras na parede do casco e separação do estrato laminar do estrato médio. Na avaliação histopatológica há hiperplasia, acantose e paraceratose do topo das lâminas e alterações ocasionais nas paredes laterais das lâminas do casco. Em casos avançados, o epitélio germinativo do topo das lâminas perde a aparência colunar normal e fica atenuado e desorganizado. Cristas de ceratina paraceratótica podem estar parcialmente mineralizadas e separadas por ceratina ortoceratótica derivada das paredes laterais das lâminas epidérmicas aparentemente normais (O'TOOLE; RAISBECK, 1995).

Na cauda ocorre queda de pelos e é observada atrofia de folículos que estão colapsados e na maioria dos casos não tem haste pilosa. Há ceratose folicular superficial e a bainha radicular externa (BRE) do folículo piloso têm ceratinócitos pouco laminados, que ocasionalmente estão disceratóticos. A bainha radicular interna (BRI) pode ser pouco desenvolvida ou ausente e alguns autores sugerem que essa alteração ocorra devido à selenose crônica induzir maturação terminal defeituosa dos ceratinócitos. A membrana vítrea é

espessada e enrugada e a bainha radicular fibrosa aparece espessada. Nos folículos menos afetados há hastes pequenas e desproporcionais (O'TOOLE; RAISBECK, 1995).

Os epitélios dos folículos pilosos e do casco são semelhantes, particularmente no que diz respeito à proporção de polipeptídeos de ceratina com pouco enxofre, proteínas ricas e ultra-ricas em enxofre e proteínas ricas em glicina/tirosina. As proteínas ricas em enxofre do pelo provavelmente formam uma matriz interfibrilar amorfa que separa filamentos ordenados de ceratina. Devido à semelhança química entre o selênio e o enxofre, foi proposto que as lesões epiteliais da AD resultem, da substituição de enxofre por selênio nos resíduos de cisteína das proteínas ricas em enxofre, com concomitante enfraquecimento das ligações dissulfeto (TRAUB-DARGATZ et al., 1986; O'TOOLE; RAISBECK, 1995).

O predomínio de alterações epiteliais nos cascos pode distinguir lesões induzidas por selênio daquelas vistas na laminite crônica em bovinos, na qual há alterações proeminentes na derme (córion) em adição à hiperplasia irregular do epitélio laminar. As lesões intradérmicas típicas da laminite crônica bovina, como tecido de granulação, neovascularização, agregados vasculares, inflamação e trombose são mínimas ou ausentes na intoxicação crônica por selênio (O'TOOLE; RAISBECK, 1995)

2.2.2.2 Tricotiodistrofia

Quantidades reduzidas de proteínas ricas em cistina são associadas à fraqueza estrutural da haste pilosa em condições como a tricotiodistrofia (TTD). A TTD é uma doença genética autossômica recessiva e rara em humanos, caracterizada por síntese anormal de proteínas ricas em enxofre (GUMMER et al., 1984; PRICE et al., 1980). Os cabelos de pacientes com TTD exibem alterações clínicas, microscópicas e bioquímicas altamente específicas (GUMMER et al., 1984; KHUMALO, 2005). São cabelos curtos, frágeis, achatados e com ressecamento avançado da cutícula e perda das células cuticulares de revestimento (GUMMER et al., 1984).

O diagnóstico de TTD é baseado nas alterações da composição química do cabelo (baixo conteúdo de enxofre) associadas a defeitos estruturais (ITIN et al., 2001). O conteúdo total de enxofre dos cabelos pode estar reduzido pela metade e a análise de aminoácidos demonstra que o conteúdo de cistina é notavelmente baixo (PRICE et al., 1980).

Na microscopia de luz, cabelos de pacientes com TTD tem ondulações, contornos e diâmetro irregulares (PRICE et al., 1980; ITIN et al., 2001). Além disso, podem apresentar fraturas transversais da haste e pontos de dilatação ao longo da haste que quebram facilmente (ITIN et al., 2001; WEEDON, 2002). Na microscopia de luz polarizada (exame polaroscópico) observam-se bandas claras e escuras intercaladas que conferem à haste pilosa aspecto de cauda tigrada ou zig-zag (ITIN et al., 2001; LIANG et al., 2006). Não está definido o que determina o aspecto de cauda tigrada na TTD. Possíveis explicações seriam que a estrutura química da ceratina do cabelo é anormal ou os tonofilamentos estão agrupados em uma orientação anormal (SPERLING; DiGIOVANNA, 2003).

Quando tratados pela técnica de Swift (metenamina-nitrato de prata amoniacal) e observados em microscópio eletrônico de transmissão, os cabelos de pacientes com TTD apresentam uma redução total na intensidade da coloração quando comparados a cabelos de pacientes sem TTD (GUMMER et al., 1984). Na cutícula de cabelos tricotiodistóficos, as camadas A e a exocutícula podem estar ausentes ou descontínuas e glóbulos de material eletrodenso (inclusões cistina positivas anormais) podem ser identificados na camada A e no interior da endocutícula (GUMMER et al., 1984; KHUMALO et al., 2005). A técnica de Swift é considerada um método histoquímico específico para a detecção do enxofre presente no aminoácido cistina, pois há uma correlação estequiométrica positiva entre a intensidade da coloração e a concentração de enxofre presente (SWIFT, 1967).

Ainda com relação à cutícula, pode haver arranjo anormal de microfibrilas e um menor número de camadas de células cuticulares (ITIN et al., 2001; KHUMALO et al., 2005). A ausência da exocutícula e da camada A (rica em enxofre) causa o ressecamento cuticular e enfraquecimento capilar (ITIN et al., 2001). No córtex pode se observar uma redução na matriz globular rica em cistina (GUMMER et al., 1984).

2.2.2.3 *Pili torti*

Pili torti (pelos tortuosos) é uma alteração rara, descrita em humanos, caracterizada por defeitos estruturais na haste pilosa com formação de pelos com torções e achatamento em intervalos irregulares ao longo do eixo da haste. Pode ocorrer como uma alteração isolada ou em associação a outras síndromes, particularmente as do tipo ectodérmico (MARUYAMA et al., 1994; WEEDON, 2002).

As alterações morfológicas visíveis na microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, além de hastes pilosas torcidas e achatadas, incluem quebras na cutícula e áreas de invaginação de segmentos da superfície para o interior da haste (MARUYAMA et al., 1994).

O exame histopatológico revela alterações na BRE, ao nível suprabulbar, como vacuolização de células, células eosinofílicas e picnóticas (disceratóticas) distribuídas pela bainha, e espessura não uniforme desta estrutura. Na porção média do folículo são vistas interdigitações da BRI com a haste pilosa e as células da BRI e da BRE podem estar onduladas. Além disso, na porção superior do canal folicular há formação de tampões de ceratina ondulada (MARUYAMA et al., 1994).

As alterações na espessura e a presença de células eosinofílicas e picnóticas revelam uma geração e diferenciação anormal das células das camadas da BRE. Acredita-se que a irregularidade da estrutura da BRE tenha como conseqüências a deformidade seqüencial da BRI e dos pelos, que neste nível folicular ainda são amolecidos pois não são totalmente ceratinizados (MARUYAMA et al., 1994).

2.2.2.4 Outras alterações pilosas associadas a defeitos na ceratinização em humanos

Irregularidades na haste pilosa em humanos decorrentes de defeitos envolvendo a ceratinização do córtex incluem: *trichorrhexis invaginata*, *monilethrix* e *pili anulati*. *Trichorrhexis invaginata* ou cabelo de bambú ocorre em hastes pilosas de humanos portadores da síndrome de Netherton. Nessa condição, ocorrem tumefações globosas (semelhantes aos nós do bambú) ao longo da haste pilosa, correspondentes às áreas propensas a fraturas (MASAAKI, et al., 1984; WEEDON, 2002). As tumefações são formadas por invaginações da cutícula para o interior do córtex piloso e ocorrem em locais do córtex nos quais existem defeitos intermitentes de ceratinização, resultantes de uma conversão incompleta dos grupos –SH em grupos S—S. Esse defeito torna o córtex piloso amolecido e propicia a formação dos nódulos visíveis no exame polaroscópico e na microscopia eletrônica (MASAAKI, et al. 1984).

Monilethrix é uma alteração genética autossômica e recessiva das ceratinas duras dos pelos descrita em humanos (WHITING; DY, 2006). É caracterizada por disfunções periódicas na matriz pilosa que resultam em hastes com nodos intercalados com áreas de constrições nodais (PEREIRA, 1997; WEEDON, 2002).

A alteração pilosa denominada *pili anulati* ocorre raramente em humanos. Nesta condição as hastes pilosas, quando examinadas sob microscopia de luz, apresentam áreas claras e escuras distribuídas ao longo da haste (WEEDON, 2002). É proposto que a alteração seja decorrente de um defeito no metabolismo das proteínas envolvendo uma disfunção parcial nos ribossomos das células do córtex e leva à falha na formação de fibras de ceratina (MARUYAMA et al., 1994).

2.3 Aspectos histológicos dos tecidos estudados

Nesta seção serão revisados os aspectos histológicos de estruturas ceratinizadas afetadas na intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens*, compreendendo língua, esôfago, casco, folículos pilosos e pelos.

2.3.1 Língua

A língua é um órgão muscular recoberto por um epitélio escamoso estratificado cuja estrutura e ceratinização variam conforme a região estudada, sendo mais espesso na superfície dorsal e mais fino na superfície ventral (DELLMAN; BROWN, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A superfície dorsal contém numerosas papilas, que diferem no formato e tamanho e são nomeadas de acordo com suas características morfológicas. As papilas filiformes, cônicas e lenticulares facilitam o movimento do alimento na cavidade oral; as papilas fungiformes, valadas e foliadas contém corpúsculos gustativos, que são responsáveis pela sensação do paladar (DELLMAN; BROWN, 1993).

As papilas filiformes são o tipo mais abundante (DELLMAN; BROWN, 1993). A superfície dorsal da língua bovina contém numerosas papilas filiformes pontiagudas e curvadas caudalmente (STEFLIK et al., 1983). Essas papilas se projetam além da superfície da língua; têm em média 1,5 a 2 mm de altura e 0,5 mm de diâmetro na base (STEFLIK et al., 1983). As papilas filiformes da língua bovina são estruturas altamente ceratinizadas, nas quais predomina um centro de ceratina dura, parcialmente recoberto por uma fina camada de

ceratina mole (STEFLIK et al., 1983), sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo altamente vascularizado (DELLMAN; BROWN, 1993).

A língua é recoberta por um epitélio complexo, composto por populações de células com várias funções distintas (MANABE et al., 1999). As porções laterais e ventral da língua são recobertas por epitélio não-ceratinizado, cujas células, juntamente com as células do aspecto lateral das papilas e da região interpapilar, expressam citoceratinas K4 e K13, o mesmo tipo expresso pelas células do epitélio esofágico. As células que recobrem o topo das papilas filiformes, bem como as que estão localizadas na base das mesmas expressam citoceratina K1 e K10, o mesmo tipo expresso pelos ceratinócitos da pele. Já as células que formam o centro da papila, expressam citoceratina dura e ácida, característica das células diferenciadas dos pelos e unhas (MANABE et al., 1999).

Em termos gerais, o padrão duplo de ceratinização das papilas filiformes da língua bovina se assemelha ao padrão de ceratinização que ocorre na haste do pelo (STEFLIK et al., 1983), no qual o córtex exibe ceratinização dura e a bainha radicular interna, ceratinização mole (STEFLIK et al., 1983). Acredita-se que a coexistência de diferentes programas de expressão de ceratinas reflitam as exigências de que o epitélio da língua seja tanto duro como flexível e assim resistente a fricção e a expansão que acompanham os movimentos da língua durante a alimentação (MANABE et al., 1999).

2.3.2 Esôfago

O esôfago é um tubo muscular modificado para a movimentação voluntária e involuntária de alimentos para dentro e para fora do estômago. O epitélio da mucosa é pavimentoso estratificado. A ceratinização superficial é observada nas espécies que ingerem alimentos duros e secos, como nos bovinos (BANKS, 1991).

2.3.3. Casco

O casco é um estojo córneo que envolve os tecidos internos e sensíveis da extremidade distal dos membros dos animais ungulados (DELLMAN; BROWN, 1993). Os bovinos são

animais biungulados, ou seja, seu casco consiste de dois dígitos. Externamente, o casco bovino apresenta as seguintes porções: coroa (região da junção do casco à pele do membro), parede (porção do casco visível quando o dígito está em contato com o solo) e sola (região ventral do casco que se apóia no solo) (STUMP, 1967). As principais estruturas internas do casco bovino estão apresentadas na Figura 4A.

A parede do casco é uma continuação modificada da epiderme. No casco, essa epiderme apresenta ceratinização dura, caracterizada pela ausência dos estratos granuloso (formação de grânulos de cerato-hialina) e lúcido. O estrato basal é a camada mais profunda da epiderme e consiste de uma única camada de células próxima ao córion. O estrato espinhoso, com uma ou várias camadas, é formado por células que migraram do estrato basal e sofrem ceratinização (STUMP, 1967).

A parede do casco é dividida em três camadas que de fora para dentro são: estrato externo ou tectório, estrato médio e estrato interno ou laminar (BERTRAM; GOSLINE, 1987). O estrato externo é uma delgada camada que protege e reduz a perda de umidade do casco (STUMP, 1967). É formado por ceratina tubular macia e escamosa, originada das camadas germinativas da epiderme do periópulo (BERTRAM, 1987; DELMANN, 1993).

O estrato médio corresponde à maior porção e é a principal estrutura de sustentação da parede do casco (BERTRAM; GOSLINE, 1987; DELLMAN; BROWN, 1993). É composto por ceratina dura tubular e intertubular produzidas pelo estrato germinativo da epiderme que reveste o sulco coronário (STUMP, 1967; BERTRAM; GOSLINE, 1987; MARSHALL et al., 1991; DELLMAN; BROWN, 1993). Cada túbulo é contínuo desde sua origem no sulco coronário até a superfície de contato com o solo (POLLITT, 2008) e é paralelo à superfície externa do casco (BACHA JR; WOOD, 1990). Em seções transversais, os ceratinócitos dos túbulos são arranjados ao redor de uma medula central oca (Figura 4B) em camadas não-pigmentadas concêntricas. A porção tubular do casco, formada por ceratina dura é rica em pontes dissulfeto e tem grande resistência física (POLLITT, 2008).

Os espaços entre a ceratina tubular são preenchidos por ceratina intertubular, elaborada a partir do epitélio germinativo na região profunda das papilas epidérmicas (BANKS, 1991). Os ceratinócitos amadurecem no casco intertubular e formam a matriz celular ceratinizada na qual os túbulos estão embebidos. A ceratina intertubular é formada em ângulos retos em relação à ceratina tubular e é responsável por grande parte da rigidez e resistência do casco (POLLITT, 2008).

A camada mais interna da parede do casco, o estrato laminar, é constituído de séries de lençóis epidérmicos ou lâminas epidérmicas aderidas à porção interna do estrato médio

(STUMP, 1967). Nessa região, as lâminas dérmicas e epidérmicas se interdigitam e formam lâminas paralelas umas as outras (Figura 4C) que são orientadas perpendicularmente ao solo (STUMP, 1967; BERTRAM; GOSLINE, 1987). O arranjo peculiar dessas lâminas forma uma grande área de superfície que contribui na suspensão da terceira falange dentro da parede do casco (STUMP, 1967).

As lâminas epidérmicas têm a camada basal composta por células colunares que contém quantidades consideráveis de tonofilamentos e poucas organelas. Sua adesão à camada espinhosa é marcada pela presença de numerosos desmossomos (STUMP, 1967; BERTRAM; GOSLINE, 1987). O material córneo, ou seja, ceratina dura não tubular, é elaborado em sentido perpendicular ao estrato médio ao qual se funde, auxiliando na sustentação da parede do casco à pata (BANKS, 1991; BERTRAM; GOSLINE, 1987).

A camada germinativa da epiderme ao longo de todo o casco está em contato direto com o córion que é uma continuação direta da derme da pele (STUMP, 1967). Ela forma a camada de tecido conjuntivo rico em colágeno, elastina, vasos sanguíneos e nervos, que dá suporte e fornece nutrientes para a epiderme (STUMP, 1967; TOMLINSON et al., 2004).

O córion do casco pode ser tanto papilado como laminado dependendo se a epiderme adjacente contém ceratina papilada ou laminada respectivamente (MÜLLING et al., 1999). Os córions perióplico, coronário e da sola são papiliformes na região da junção com a epiderme enquanto que, o córion laminar forma lâminas que seguem paralelas umas as outras numa direção proximal-distal. Isso funciona como uma estrutura de adesão entre o casco e as estruturas mais profundas do dígito, isto é, a terceira falange e o tecido subcutâneo (STUMP, 1967).

A parede do casco cresce durante toda a vida do animal. A regeneração contínua da parede do casco ocorre no sulco coronário, onde as células germinativas produzem populações de células filhas que amadurecem, ceratinizam e são adicionadas continuamente a parede proximal do casco (POLLITT, 2008). A ceratinização do casco é um processo dinâmico, caracterizado por altas taxas de síntese de ceratina e substâncias intercelulares cimentantes. Para tal, as células epidérmicas requerem um aporte de nutrientes, vitaminas e minerais adequado e suficiente. Esse aporte é dado através da difusão desses elementos a partir de vasos sanguíneos da derme adjacente (MÜLLING et al., 1999).

2.3.4 Folículos pilosos e pelos

O pelo é uma estrutura flexível e ceratinizada produzida pelo folículo piloso, estrutura de origem ectodérmica que se desenvolve a partir de uma invaginação da epiderme (DELLMAN; BROWN, 1993; ITIN; FISTAROL, 2005). O folículo piloso possui cinco componentes principais: a papila dérmica do pelo, a matriz do pelo, o próprio pelo, a bainha radicular interna (BRI) e a bainha radicular externa (BRE) (SCOTT; MILLER, 1996) (Figuras 5A e B).

Com propósitos descritivos, o folículo piloso longitudinalmente é dividido em três regiões anatômicas distintas: a porção inferior que se estende da papila dérmica até a inserção do músculo eretor do pelo; a porção média, ou istmo, que se estende desde a inserção do músculo eretor do pelo até a entrada do canal sebáceo; e a porção superior, ou infundíbulo, que compreende a porção entre a entrada do canal sebáceo até o orifício folicular (LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991; SCOTT; MILLER, 1996).

A papila dérmica é um prolongamento do tecido conjuntivo dérmico delimitado por uma continuação fina da membrana basal (BANKS, 1991). É considerada um componente mesenquimal do folículo piloso e é recoberta por células pluripotenciais que formam a matriz do pelo, de onde emerge a haste pilosa (SCOTT; MILLER, 1996). Na fase de crescimento (anágena), as células da matriz se multiplicam e se diferenciam em vários tipos celulares que dão origem ao pelo e à BRI (SCOTT; MILLER, 1996).

As duas bainhas epiteliais do folículo piloso, a BRI e a BRE, envolvem o eixo do pelo na sua porção inicial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). A BRI é originada das células pluripotenciais da matriz do pelo e é composta por três camadas concêntricas que são de dentro para fora, a cutícula da BRI, a camada de Huxley e a camada de Henle (DELLMAN; BROWN, 1993; SCOTT; MILLER, 1996) e têm a função principal de envolver e modelar o pelo (SCOTT; MILLER, 1996).

A cutícula da BRI é uma monocamada de células ceratinizadas sobrepostas, semelhantes às da cutícula do pelo, à exceção de suas bordas livres, que estão orientadas na direção oposta, ou seja, no sentido do bulbo do pelo (Figura 5C) (BANKS, 1991; DELLMAN; BROWN, 1993). Essa disposição resulta em um perfeito encaixe entre a cutícula do pelo e a cutícula da BRI, o que auxilia na firme fixação do pelo ao folículo durante o crescimento progressivo do pelo (HAM; CORMACK, 1983; BANKS, 1991; LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991; DELLMAN; BROWN, 1993; SCOTT; MILLER, 1996).

A camada de Huxley é composta por uma a três camadas de células nucleadas e ceratinizadas ricas em grânulos de trico-hialina na região ceratogênica do folículo (LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991; DELLMAN; BROWN, 1993; SCOTT; MILLER, 1996). A camada mais externa, camada de Henle, é formada por uma camada única de células ceratinizadas não-nucleadas que já possuem grânulos de trico-hialina em sua emergência da matriz pilosa (LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991; DELLMAN; BROWN, 1993; SCOTT; MILLER, 1996). Os grânulos de trico-hialina são grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, cujo principal componente é protéico. A trico-hialina funciona como uma proteína associada à ceratina e promove o alinhamento e a agregação lateral dos feixes paralelos de filamentos intermediários nas células da BRI (SCOTT; MILLER, 1996).

A BRE é uma extensão da epiderme no sentido inferior e é composta por diversas camadas de células semelhantes as do estrato espinhoso da epiderme (DELLMAN; BROWN, 1993; SCOTT; MILLER, 1996). É mais espessa perto da epiderme e gradualmente diminui de espessura em direção ao bulbo do folículo. Em sua posição inferior (do istmo do folículo piloso para baixo), ela é recoberta pela BRI (LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991) e não sofre ceratinização (SCOTT; MILLER, 1996; GINN et al., 2007). As células da BRE possuem citoplasma claro, vacuolizado, em virtude da considerável quantidade de glicogênio (LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991). Na região do infundíbulo, a BRE sofre ceratinização triquilêmica, ou seja, sem a participação de grânulos de cerato-hialina (SCOTT; MILLER, 1996; GINN et al., 2007).

A parte epidérmica do folículo piloso está separada da derme por uma espessa lâmina basal, correspondente à membrana basal da epiderme, associada a fibras reticulares que, devido a sua aparência brilhosa, é denominada de membrana vítrea. O tecido conjuntivo que envolve o folículo é composto de feixes espessos de colágeno e recebe o nome de bainha radicular fibrosa (BRF) (LEVER; SCHAUMBURG-LEVER, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; GINN et al., 2007).

A formação de pelos é a função primária das células dos folículos pilosos. Esse processo é dinâmico e requer proliferação, movimentação e migração celulares, diferenciação em várias linhagens celulares e degradação de células não utilizadas quando a formação do pelo é completada (MARSHALL, 1991). Os pelos não crescem continuamente, e sim em ciclos e o aspecto histológico dos folículos pilosos varia com os estágios do ciclo folicular (SCOTT; MILLER, 1996; GINN et al., 2007). O ciclo do pelo consiste na fase de crescimento anágena, a fase de transição ou involução (catágena) e a fase de repouso (telógena; GINN et

al., 2007). A taxa de crescimento do cabelo humano é de 0,4 mm/dia (HAM; CORMACK, 1983).

Um pelo típico é composto de três estruturas: medula, córtex e cutícula (BANKS, 1991). A medula é formada a partir das células centrais da matriz do pelo. É composta de fileiras longitudinais de células cubóides ou achatadas, fracamente ceratinizadas e vacuolizadas (BANKS, 1991; SCOTT; MILLER, 1996). Na região próxima à matriz do pelo as células são compactas e o restante da haste contém vacúolos de ar e de glicogênio (SCOTT; MILLER, 1996).

Ao redor da medula se diferenciam células mais ceratinizadas e com um arranjo mais compacto que formam o córtex do pelo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). As células corticais, as mais abundantes da haste pilosa, são células fusiformes, completamente cornificadas, que têm o eixo mais longo paralelo ao eixo da haste e contém o pigmento melanina que confere cor ao pelo (MARSHALL et al., 1991; SCOTT; MILLER, 1996). A ceratina dura é o componente principal das células corticais. Noventa por cento da célula cortical é formada por filamentos intermediários de ceratina alinhados, associados à matriz protéica interfibrilar (MARSHALL et al., 1991).

A cutícula, a camada mais externa do pelo, é formada por células retangulares, achatadas, anucleadas, e fortemente ceratinizadas (MARSHALL et al., 1991; SCOTT; MILLER, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Essas células estão distribuídas como telhas num telhado, cujas bordas, voltadas para a ponta do pelo, recobrem parcialmente as células cuticulares adjacentes (MARSHALL et al., 1991; SCOTT; MILLER, 1996). O número de camadas de células cuticulares varia de uma, na lã, a 35, na cerda de suíno (MARSHALL et al., 1991).

As células cuticulares têm uma estrutura trilaminar composta pela epicutícula, exocutícula e endocutícula, sendo as duas últimas ricas em enxofre (MARSHALL et al., 1991) (Figura 5D).

A epicutícula tem cerca de 3 nm de espessura e não é visível em preparações padrão para microscopia eletrônica. É a camada mais externa da cutícula e recobre cada célula cuticular individualmente. No interior da exocutícula há uma camada de proteína muito rica em enxofre com uma espessura em torno de 40 nm que é denominada de camada A. Na microscopia eletrônica de transmissão em que é usada metenamina-nitrato de prata, a exocutícula é vista como uma camada eletrodensa enquanto que a endocutícula é eletroluscente (KHUMALO, 2005).

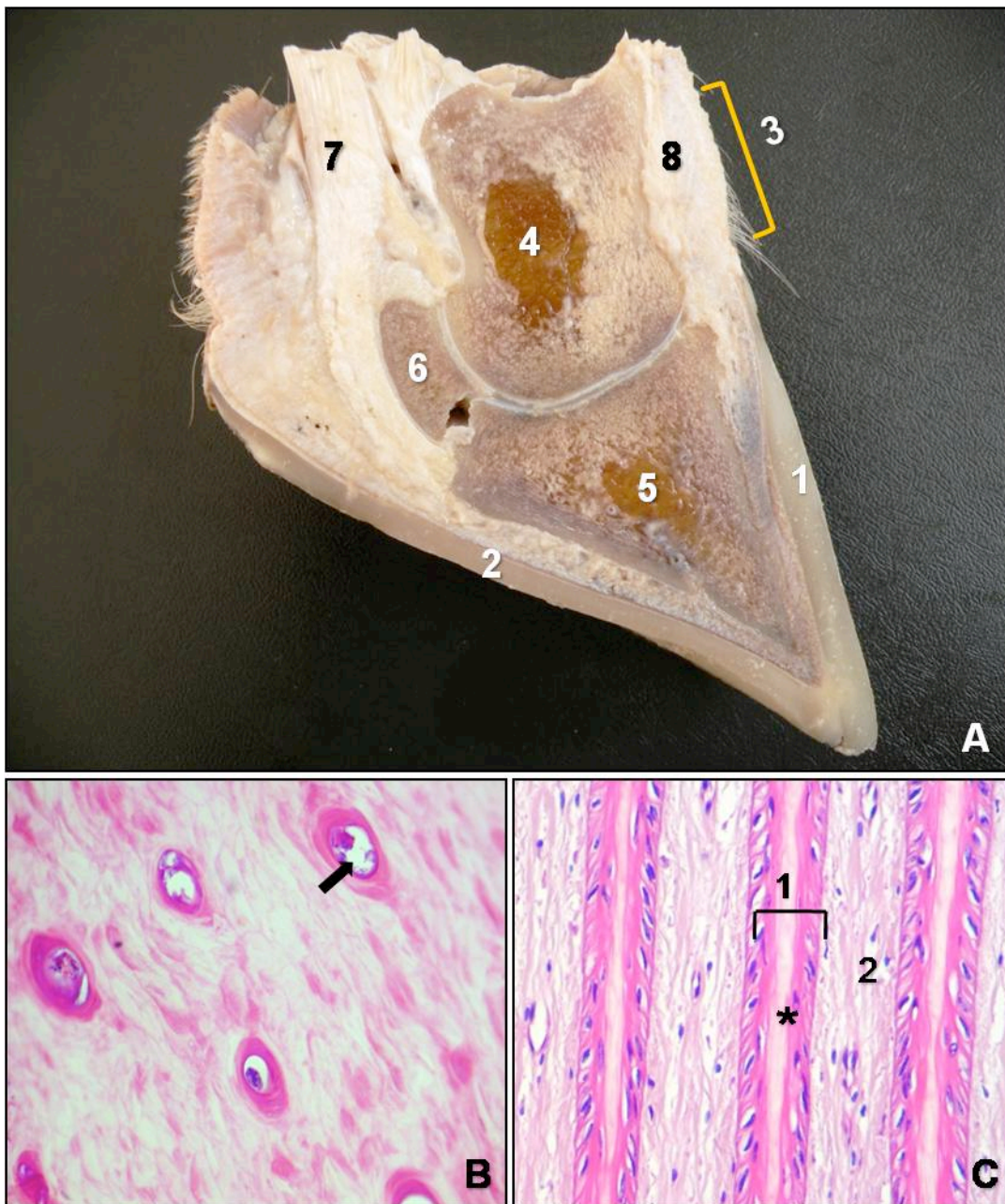


Figura 4 – A) Corte sagital de dígito bovino mostrando a parede do casco (1), a sola (2), o perióplio (3), as falanges média (4) e distal (5), o sesamóide distal (6) e os ligamentos flexor digital profundo (7) e extensor digital comum (8). B) Casco bovino; estrato médio. Observa-se que a ceratina tubular é formada por ceratinócitos arranjados ao redor de uma medula central clara (seta). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 40x. C) Casco bovino; estrato laminar. Observam-se lâminas epidérmicas (1), com ceratina laminar central (*), paralelas às lâminas dérmicas (2). HE, obj. 20x.

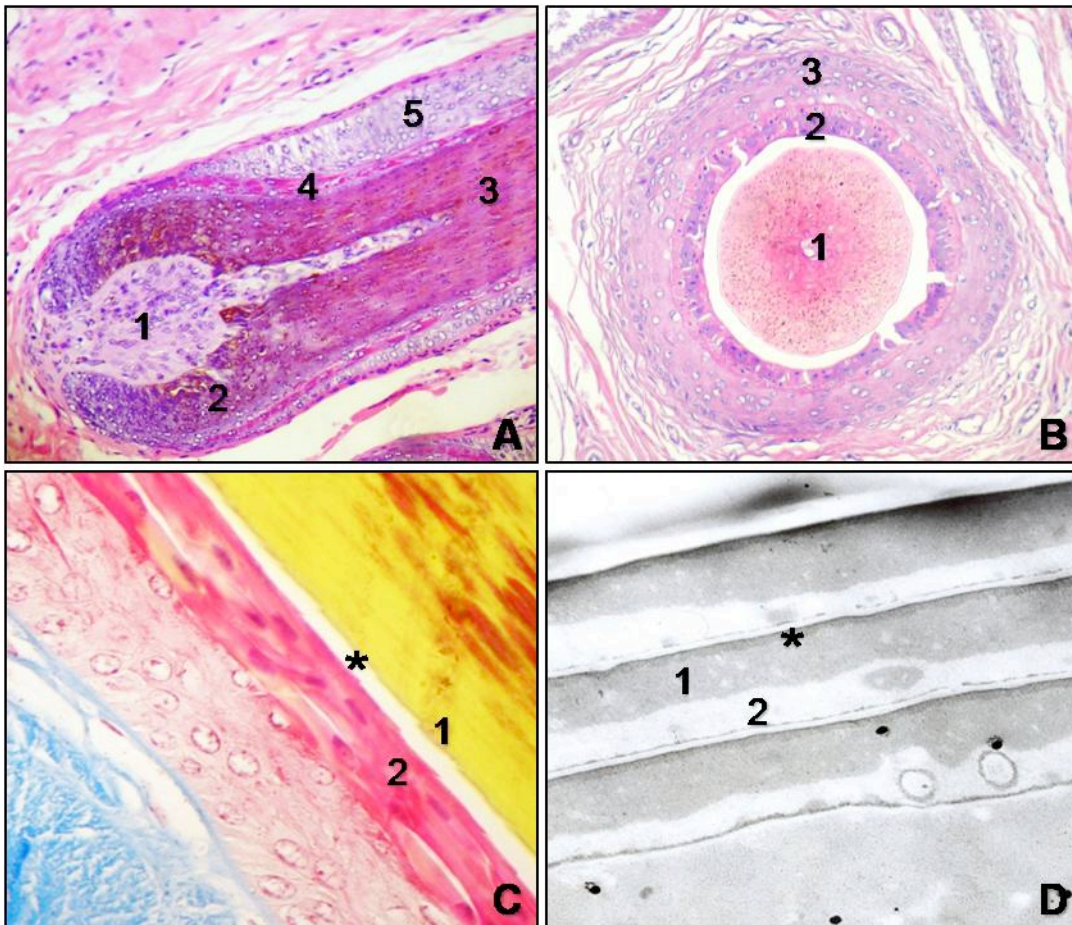


Figura 5 – A) Corte longitudinal da pele da cauda de um bovino mostrando pelo e folículo piloso em fase anágena. Observam-se as estruturas principais do pelo e do folículo piloso: papila dérmica (1); matriz pilosa (2); pelo (3); bainha radicular interna (BRI; 4); bainha radicular externa (BRE; 5). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Corte transversal da pele da cauda de um bovino. Observa-se um pelo (1), a BRI (2) e a BRE (3). HE, obj. 20x. C) Corte longitudinal de cauda bovina. Observam-se as células da camada cuticular do pelo orientadas em direção à ponta do pelo (1) e as células da camada cuticular do folículo piloso (2) orientadas em direção ao bulbo piloso. As células cuticulares pilosas e foliculares estão separadas por um espaço (*) que é um artefato do processamento histológico. Tricrômico de Masson (com ácido pícrico), obj. 40x. D) Cutícula da haste pilosa bovina. Há três células cuticulares, nas quais se observa a exocutícula (1) e a endocutícula (2). Na exocutícula observa-se a camada A (*). Microscopia eletrônica de transmissão, método de Swift, aumento de 30.000 x.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para o estudo da patogênese da intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* foram utilizadas amostras provenientes de dois surtos (total de 9 bovinos; surto A com 6 bovinos [Bovinos 1-6] e surto B com 3 bovinos [Bovinos 7-9]) e de dois estudos experimentais (total de 4 bovinos; estudo A com 3 bovinos [Bovinos 13-15] e estudo B com 1 bovino [Bovino 16]). Dados epidemiológicos e clínico-patológicos dos casos espontâneos foram publicados por Barros et al. (2006). Informações semelhantes referentes a três casos experimentais (estudo A) foram publicadas por Schons et al. (2007).

As alterações clínicas e macroscópicas foram brevemente relatadas. Para a investigação da patogênese das lesões observadas na língua, esôfago, casco e pele da cauda, foram avaliadas as alterações histopatológicas e aspectos histoquímicos e histoquímico-ultra-estruturais em tecidos selecionados.

Dados de resenha dos bovinos e parâmetros avaliados são apresentados nas Tabelas 1 (casos espontâneos) e 2 (casos experimentais). As técnicas histológicas e histoquímicas foram realizadas em blocos de parafina já existentes ou amostras provenientes de novos encaminhamentos dos materiais fixados em formol a 10%.

3.2 Estudo morfológico

Dos casos espontâneos (surtos A e B) e do estudo experimental A, foram analisados os seguintes tecidos: língua (região cranial), esôfago, casco (estrato laminar) e cauda (pelos destacados e pele da região da vassoura da cauda). Do estudo experimental B, foram avaliados os pelos da vassoura da cauda. Amostras dos mesmos tecidos estudados foram obtidas de quatro bovinos (10, 11, 12 e 17) sem alterações nos locais avaliados e utilizadas como controles.

Tabela 1 – Dados de resenha dos bovinos e parâmetros avaliados em tecidos selecionados dos casos de intoxicação espontânea por *Ramaria flavo-brunnescens*.

Dados do animal					Parâmetros avaliados			
Número	Protocolo	Raça	Sexo	Idade	HE	OSC	Masson	Polarização
1	Vn 134/05	Mista	Macho	1 ano	●	●	●	●
2	Vn 141/05	Mista	Macho	18 meses	●	●	●	●
3	Vn 142/05	Mista	Macho	19 meses	●	●	●	●
4	Vn 143/05	Mista	Macho	18 meses	●	●	●	●
5	Vn 146/05	Mista	Macho	18 meses	●	●	●	●
6	Vn 150/05	Mista	Macho	18 meses	●	●	●	●
7	Vn 162/05	Mista	Macho	22 meses	●	●	●	●
8	Vn 163/05	Mista	Macho	22 meses	●	●	●	●
9	Vn 164/05	Mista	Macho	22 meses	●	●	●	●
10	Vn 331/07	Mista	Fêmea	4 anos	●	●	●	●
11	Vn 354/07	Mista	Fêmea	2 anos	●	●	●	●
12	Vn 357/07	Mista	Fêmea	2 anos	●	●	●	●

● = parâmetro avaliado (em seções selecionadas de língua, esôfago, casco, cauda ou hastes pilosas da vassoura da cauda); HE: hematoxilina-eosina; OSC: oxidação seletiva da ceratina; Masson: Tricrômico de Masson.

Tabela 2 – Dados de resenha dos bovinos e parâmetros avaliados em tecidos selecionados dos casos de intoxicação experimental por *Ramaria flavo-brunnescens*.

Dados do animal					Parâmetros avaliados				
Número	Protocolo	Raça	Sexo	Idade	HE	OSC	Masson	Polarização	H-ME
13	E287	Jersey	Macho	9 meses	●	●	●	-	-
14	E288	Jersey	Macho	9 meses	●	●	●	-	-
15	E289	Jersey	Macho	9 meses	●	●	●	-	-
16	Bovino G	Mista	Fêmea	8 meses	-	-	-	●	●
17	E4411	Jersey	Macho	9 meses	●	-	●	-	-

● = parâmetro avaliado (em seções selecionadas de língua, esôfago, casco, cauda ou hastes pilosas da vassoura da cauda); - = parâmetro não avaliado; HE: hematoxilina-eosina; OSC: oxidação seletiva da ceratina; Masson: Tricrômico de Masson; H-ME: método histoquímico-ultra-estrutural.

Para a avaliação histopatológica da língua, esôfago, casco e cauda, após a fixação em formol a 10%, as amostras foram processadas e coradas rotineiramente para histopatologia (hematoxilina-eosina). As técnicas histológicas foram realizadas em blocos de parafina existentes no acervo e em blocos provenientes de novos encaminhamentos dos materiais fixados em formol. Múltiplas seções de cada tecido foram avaliadas.

As amostras de língua foram obtidas a partir de seções transversais da porção cranial da língua. As amostras do esôfago foram colhidas aleatoriamente e de áreas ulceradas.

As amostras do estrato laminar dos cascos com lesões e dos cascos usados como controle foram obtidas conforme o protocolo descrito a seguir. Os dígitos dos bovinos foram desarticulados ao nível da articulação da falange proximal e média e a ponta do casco foi serrada para uma melhor penetração do fixador (formol a 10%). Após fixado, foi obtida uma

fatia de aproximadamente 0,3 cm de espessura paralela à ponta do casco serrada anteriormente (Figuras 6A e B). A região laminar foi identificada e foi separada do osso da falange distal e do estrato médio da parede do casco, com o auxílio de um bisturi (Figuras 6C e D).

Para a avaliação das alterações dos pelos e folículos pilosos, seções transversais e longitudinais foram obtidas da pele da região da vassoura da cauda. Foram avaliadas hastes de pelos (que se desprenderam facilmente) tracionadas durante a avaliação clínica ou necropsia dos casos espontâneos de intoxicação pelo cogumelo. As hastes foram fixadas em lâminas histológicas com fita adesiva, deixando livre o segmento inferior, o qual foi examinado em microscópio sob luz polarizada. Hastes de pelos do Bovino 16 (no dia 0) foram utilizadas como controle para o exame polaroscópico.

3.3 Estudo histoquímico

O estudo histoquímico foi realizado em seções da língua, casco e cauda através do método de oxidação seletiva da ceratina e do Tricrômico de Masson.

3.3.1 Método de oxidação seletiva para a demonstração de ceratina (OSC):

A técnica foi realizada de acordo com Pearse (1951), modificada por Lillie & Bangle (1954). Blocos de parafina contendo seções de língua, casco e cauda foram cortados em 5 μ m. As lâminas foram desparafinizadas e posteriormente imersas em solução oxidante de ácido peracético (Apêndice A). Após, as lâminas foram lavadas por 3 min em água corrente e o reagente de Schiff foi pingado sobre os cortes permanecendo sobre os mesmos por 30 min. As lâminas foram lavadas em água corrente quente por 10 min, desidratadas em alcoóis, clarificadas em xilol e montadas em resina sintética e lamínulas.

3.3.2 Tricrômico de Masson

A técnica de Tricrômico de Masson foi realizada utilizando-se o Kit EasyPath Tricrômio de Masson (com azul de anilina; Erviegas, cód. EP-142051). Esse método inclui ácido pícrico no protocolo.

3.3.3 Estudo histoquímico-ultra-estrutural

Cutículas de pelos da vassoura da cauda de um bovino (Bovino 16), intoxicado experimentalmente conforme metodologia descrita por Kommers & Santos (1995), foram avaliadas ultra-estruturalmente. Resumidamente, num período de 15 dias, o bovino recebeu oito administrações de 20 g/kg de cogumelo fresco triturado em liquidificador através de sonda oroesofágica. Para a determinação da região a ser avaliada pela microscopia eletrônica de transmissão, antes da primeira administração (dia 0) os pelos da vassoura da cauda do Bovino 16 (de pelagem branca) foram pintados com tintura para cabelos (Koleston-Wella) da cor castanho-escuro, tomando-se o cuidado para que a tintura atingisse a pele subjacente. Após 40 minutos, a tintura foi removida com água e sabão glicerinado. Logo a seguir, foi colhida a primeira amostra de pelos que serviu como controle. Hastes de pelos foram colhidas no 5º, 10º e 15º dias subsequentes. Os pelos controle (dia 0) e os colhidos nos dias 5, 10 e 15 foram fixados em lâmina histológica com fita adesiva, deixando livre somente a parte branca (não corada pela tintura) que correspondia, no dia 0, à porção do pelo que encontrava-se dentro do folículo piloso e, no caso dos dias 5, 10 e 15, à porção que cresceu sob influência do princípio tóxico do cogumelo. Esta porção foi medida com régua e observada diretamente sob microscopia de luz polarizada.

Fragmentos de pelos colhidos nos dias 0, 5, 10 e 15 (cinco hastes com 2 mm de comprimento) foram cortados (localização conforme a Figura 7), embebidos em éter etílico por 24 horas (para desengordurar), desidratados em álcool absoluto (2 vezes de 30 minutos) e incluídos em resina epóxi. Cortes semi-finos foram corados pelo azul de toluidina para exame em microscopia de luz, visando selecionar os pelos para os cortes ultra-finos. Cortes ultra-finos foram colocados em grades de ouro sobre os quais aplicou-se a técnica de Swift (Apêndices B e C) para o estudo histoquímico-ultra-estrutural do conteúdo de cistina em

fotomicrografias (obtidas em microscópio Zeiss-EM 10) de seções transversais das células cuticulares pilosas.

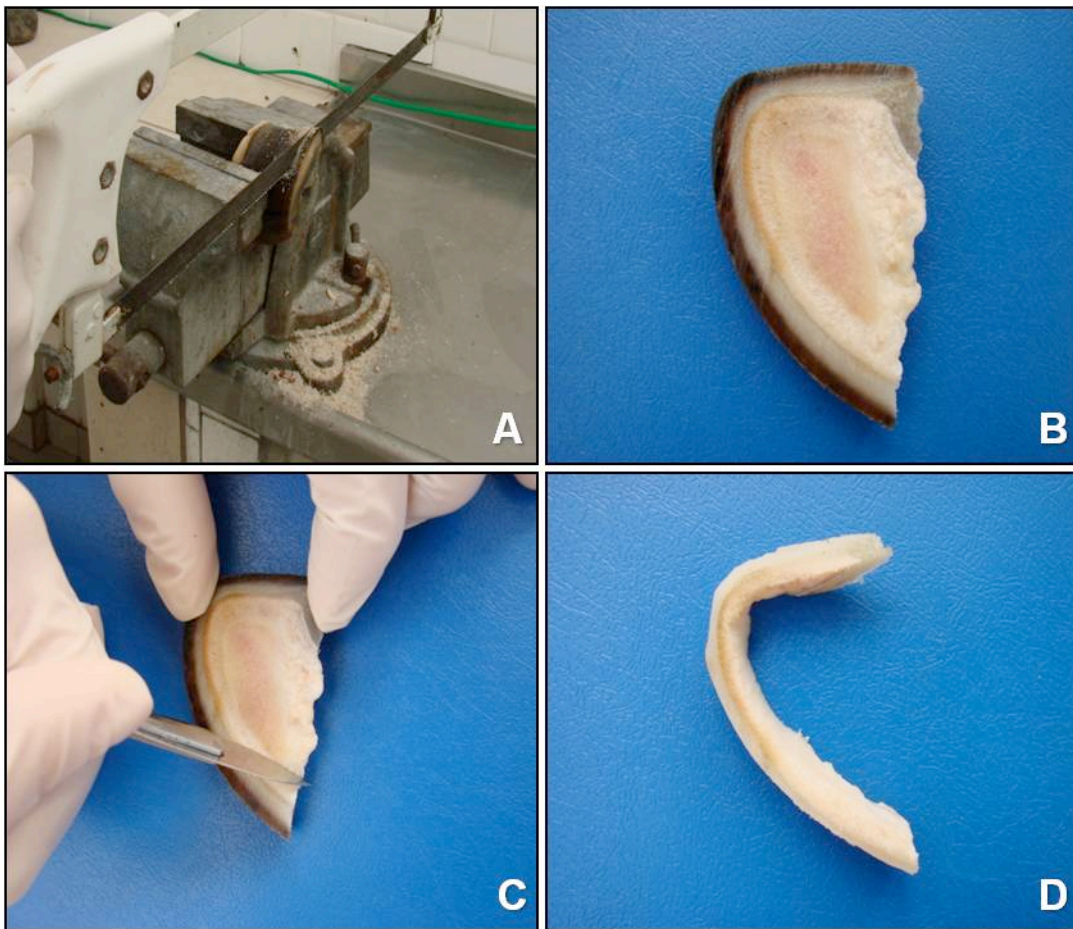


Figura 6 - Método de encaminhamento do casco bovino para obtenção de seções do estrato laminar. A) Corte transversal da ponta do dígito. A peça é fixada em um torno e o corte é efetuado com uso de serrote. B) Fatia de casco obtida através de corte transversal da ponta do casco. C) Identificação e separação do estrato laminar. D) Amostra da região laminar pronta para processamento.

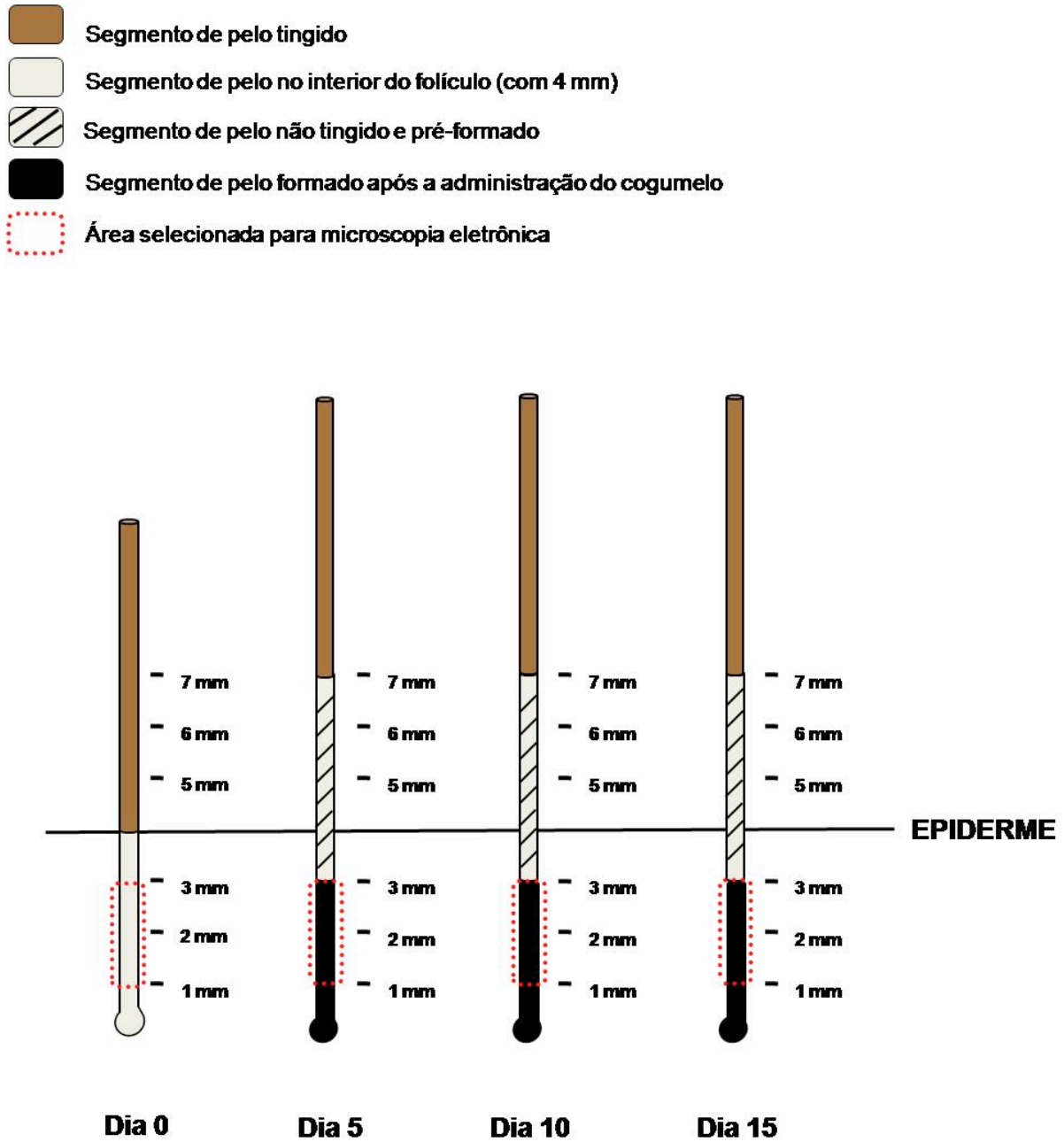


Figura 7 - Representação esquemática do crescimento dos pelos durante o experimento com demonstração da área de coleta de material para microscopia eletrônica (técnica de Swift).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

A intoxicação espontânea (surto A e B) por *Ramaria flavo-brunnescens* (Figura 8A) em bovinos cursou com alterações clínico-patológicas que incluíram alisamento da superfície dorsal da língua, com perda das papilas filiformes e áreas de ulceração (Figura 8B); ulceração esofágica multifocal (Figura 8C) e afrouxamento e queda dos pelos, principalmente da vassoura da cauda (Figura 8D). Nos bovinos experimentais (estudo A), as lesões foram semelhantes, porém mais brandas, não tendo sido observadas alterações esofágicas.

As principais alterações histopatológicas observadas na língua dos bovinos intoxicados, tanto espontaneamente como experimentalmente envolveram a superfície dorsal e tem sua distribuição e intensidade apresentadas na Tabela 3. Mais frequentemente ocorreram adelgaçamento do epitélio, desaparecimento de papilas filiformes e ulceração multifocal associada a tecido fibrovascular subjacente. Re-epitelização, projeções irregulares do epitélio para a lâmina própria, estratificação irregular do epitélio, formação de ceratina lamelar, ceratinização individual e vacuolização citoplasmática de ceratinócitos também foram observadas.

Tabela 3 – Principais alterações histopatológicas observadas na língua dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens*.

Alteração	Bovinos intoxicados											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	13	14	15
Redução na espessura do epitélio	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2
Desaparecimento de papilas filiformes	3	3	3	3	2	2	3	3	3	2	1	1
Ulceração	3	3	2	2	0	0	3	3	3	0	0	0
Tecido fibrovascular	3	3	2	2	0	1	3	3	2	0	0	0
Re-epitelização	1	1	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0
Projeções irregulares do epitélio	2	0	3	2	1	2	0	0	1	0	0	0
Estratificação irregular do epitélio	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Ceratinização lamelar focal	0	0	3	3	1	3	0	0	3	0	0	0
Ceratinização individual de células	1	0	1	2	1	2	0	0	3	1	0	0
Vacuolização de ceratinócitos	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0

0 = ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= acentuado

Uma alteração presente em todos os casos foi o adelgaçamento do epitélio da língua, que em casos acentuados tinha cerca de 1/3 da espessura do epitélio de uma língua normal. A diminuição na espessura do epitélio dos casos em que não havia ulceração envolveu a totalidade da superfície dorsal da língua examinada. Porém, nos casos com ulceração, observou-se que o adelgaçamento era ainda mais pronunciado nas áreas adjacentes às úlceras.

Quanto às papilas filiformes, as lesões variaram de leve atenuamento até o desaparecimento total dessas estruturas (Figuras 9A e B). Observaram-se alterações morfológicas inicialmente na base das papilas com desorganização dos ceratinócitos, muitos deles com vacúolos e depósitos eosinofílicos densos intracitoplasmáticos.

Pela técnica do Tricrômico de Masson observou-se alteração na coloração das papilas filiformes (mudança da coloração de amarelo para vermelho) quando comparadas às línguas controle (Figuras 10A, B e C). Observou-se marcada redução na intensidade da coloração da ceratina dura do centro das papilas filiformes (mudança de rosa-forte para rosa-claro), evidenciada pela técnica de oxidação seletiva de ceratina (Figuras 11C e D).

As úlceras foram frequentemente observadas (7/12) e eram focais, multifocais ou envolviam todo o epitélio dorsal. Eram recobertas por variável quantidade de fibrina e agregados bacterianos basofílicos intralesionais e associadas a infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e tecido fibrovascular (Figuras 12A e B). O tecido fibrovascular na lâmina própria subjacente às regiões ulceradas era caracterizado por proliferação de fibroblastos, acúmulo de colágeno (melhor visualizado pela técnica de Tricrômico de Masson) e numerosos vasos sanguíneos neoformados (Figura 12B). Em muitas áreas havia um epitélio estreito (re-epitelização) recobrimdo área de tecido fibrovascular (Figura 12C). Em uma língua (Bovino 1) foi observado um trombo em um vaso da submucosa.

Em muitas línguas (6/12) foram observadas projeções irregulares do epitélio para a lâmina própria (Figura 13A). Nas extremidades destas projeções (que às vezes eram visualizadas como ninhos desconectados do epitélio), em muitos casos, havia ceratinização lamelar central (Figura 13B).

Observou-se, ocasionalmente, estratificação irregular do epitélio lingual (Bovinos 4 e 6). Nessas áreas os ceratinócitos perdiam sua orientação normal e formavam pequenos grupos em arranjo concêntrico (Figuras 13C).

Em metade das línguas analisadas havia ceratinização individual de células caracterizada por ceratinócitos arredondados, circundados por um halo claro, com citoplasma fortemente eosinofílico e núcleo pequeno e hiperclomático (Figura 13D). Essas células eram

distribuídas aleatoriamente pelo epitélio, porém pareciam mais abundantes na região suprabasal. Ocasionalmente havia ceratinócitos com vacúolos citoplasmáticos.

As principais alterações observadas no esôfago dos bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* encontram-se na Tabela 4. Todos os esôfagos analisados apresentaram algum grau de redução na espessura epitelial, sendo, na maioria dos casos, moderado (Figuras 14A e B). Ulceração foi um achado muito frequente (6/12) (Figura 14C). As úlceras eram recobertas por fibrina, debris celulares e neutrófilos íntegros e degenerados. Em muitos locais foram observados agregados bacterianos basofílicos intralesionais. Em áreas subjacentes às úlceras havia graus variáveis de proliferação de tecido fibrovascular e re-epitelização (Figura 14D). Ocasionalmente observou-se epitélio exibindo projeções irregulares para a submucosa (Figura 14E) e áreas do epitélio com ceratinócitos com morfologia alterada e vacuolização (Figura 14F). Em um esôfago (Bovino 4), foi observado um trombo na lâmina própria.

Tabela 4 – Principais alterações histopatológicas observadas no esôfago dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens*.

Alteração	Bovinos intoxicados											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	13	14	15
Redução na espessura do epitélio	2	2	2	2	2	3	2	3	3	1	2	2
Ulceração	2	3	3	3	2	0	3	0	0	0	0	0
Tecido fibrovascular	2	2	2	2	3	0	2	0	0	0	0	0
Reepitelização	2	1	1	0	2	0	2	0	0	0	0	0

0 = ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= acentuado

Nos cascos em que havia lesões (10/12) essas envolviam as lâminas epidérmicas do estrato laminar que apresentavam graus variáveis de fusão, encurtamento, múltiplas camadas de células não-ceratinizadas no topo, ceratinização irregular e descontínua com persistência de núcleos, ceratinização individual e vacuolização de ceratinócitos. As principais alterações observadas são apresentadas na Tabela 5.

Fusão de lâminas ocorreu em metade dos cascos analisados, em qualquer nível, no entanto foram mais comuns no topo das lâminas (Figuras 15A e B). Da mesma forma, em metade dos cascos avaliados observou-se encurtamento de lâminas epidérmicas (Figura 15C).

Tabela 5 – Principais alterações histopatológicas observadas no casco dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens*.

Alteração	Bovinos intoxicados											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	13	14	15
Fusão de lâminas epidérmicas	1	1	0	2	1	3	0	0	0	0	1	1
Lâminas epidérmicas encurtadas	1	2	0	2	1	3	0	0	2	0	0	0
Múltiplas camadas no topo das lâminas	2	1	0	1	0	3	0	2	0	0	0	0
Maior nº de camadas celulares nas lâminas	2	2	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0
Ceratina laminar descontínua	2	2	0	1	1	3	0	1	2	1	0	0
Persistência de núcleos na ceratina	1	1	0	1	2	2	0	1	2	0	0	0
Ceratinização individual de células	1	1	0	1	2	2	0	0	0	1	0	1
Vacuolização de ceratinócitos	1	1	0	2	1	2	0	0	0	0	2	2

0 = ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= acentuado

Em muitos cascos havia maior número de camadas de células no topo das lâminas (Figura 15C) e muitos ceratinócitos apresentavam alterações morfológicas como vacuolização e acúmulos citoplasmáticos eosinofílicos (Figura 15D). Alterações na ceratina laminar foram vistas em vários casos (8/12). Estas alterações atingiram grupos de lâminas seqüenciais, aleatórias ou ocorreram em todo o fragmento de casco analisado.

A partir da camada basal nas lâminas epidérmicas, havia uma desorganização na disposição dos ceratinócitos e na sua diferenciação (Figuras 16A e B). Observavam-se várias camadas de ceratinócitos, muitos deles vacuolizados, e ausência da ceratinização abrupta do centro das lâminas. Persistência de núcleos era observada em meio à ceratina formada defeituosamente (Figura 16B). Ceratinização individual de células (ceratinócitos circundados por um halo claro, com contornos arredondados, citoplasma fortemente eosinofílico e núcleo pequeno e hiper cromático) foi vista em muitos casos (7/12) (Figura 16C) e ocorreu por todo o epitélio laminar mesmo em regiões em que as alterações descritas anteriormente não foram observadas.

Através do uso do Tricrômico de Masson observou-se que a ceratina laminar defeituosa formada era irregular, fragmentada ou em casos graves, reduzida a pequenos segmentos ceratinizados (Figuras 17A e B). A ceratina laminar defeituosa, observada pela coloração de rotina, teve uma reação muito fraca pela técnica da oxidação seletiva da ceratina, quando comparada a cascos normais (Figuras 18A e B).

As principais alterações observadas nos folículos pilosos e pelos da vassoura da cauda dos bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Principais alterações histopatológicas observadas nos pelos e folículos pilosos dos bovinos intoxicados espontaneamente ou experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens*.

Alteração	Bovinos intoxicados											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	13	14	15
Folículos sem haste pilosa	3	2	2	2	2	3	2	3	2	1	1	1
Folículos pilosos com contornos irregulares	3	2	2	2	2	2	2	3	2	1	1	1
Desorganização da BRE	3	2	2	2	2	2	2	3	2	1	0	0
Degeneração da BRI	3	2	2	2	2	2	2	3	2	0	0	0
Ceratinização individual de células	3	2	3	3	3	2	2	3	2	2	1	0
Vacuolização de células da parede folicular	2	1	1	2	2	1	1	2	3	1	0	0
Hastes pilosas degeneradas/desintegradas	3	2	2	3	3	3	2	3	3	0	0	0
Hastes pilosas com contornos irregulares	3	2	2	3	3	3	2	3	3	2	1	1

0 = ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= acentuado. BRE: bainha radicular externa; BRI: bainha radicular interna.

Muitos folículos pilosos da cauda dos bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* não tinham haste de pelo em seu interior (as vezes substituída por um plugue de ceratina [ceratose folicular]) ou estavam em fase telógena. Virtualmente todos os folículos pilosos e pelos apresentaram algum tipo de alteração. Nos casos de intoxicação experimental (Bovinos 13, 14 e 15), as alterações observadas foram mais sutis que na intoxicação espontânea.

As alterações morfológicas nos folículos pilosos, na maioria dos casos, eram moderadas a severas e envolveram tanto a bainha radicular externa (BRE) quanto a bainha radicular interna (BRI). Muitos folículos tinham os contornos internos e externos alterados (Figuras 19A e B) e ocasionalmente havia espessamento da bainha radicular fibrosa (melhor observada pela técnica do Tricrômico de Masson; Figura 19C). Em um grande número de folículos observou-se que a BRE estava espessada e as células eram desalinhasadas (Figura 19 C). Nesta estrutura, a ceratinização individual de células e ceratinócitos com vacúolos claros intracitoplasmáticos foi um achado muito constante (Figura 19D).

Como na BRE, as alterações na BRI foram muito frequentes. Na maioria dos casos se caracterizaram por arranjo irregular de células, células desintegradas e finalmente, degeneração total da estrutura (Figuras 20A-D).

Em relação às alterações nas hastes pilosas, estas variaram de pelos com alterações leves nos casos experimentais (Figuras 21A e B) a pelos com contornos irregulares, extremamente tortuosos e desintegrados nos casos de intoxicação espontânea (Figuras 21C-E). Nos casos de alterações pilosas acentuadas, a identificação da haste muitas vezes se tornou difícil pela coloração de rotina. Nestes casos, a haste pilosa foi melhor visualizada através da técnica do Tricrômico de Masson, na qual hastes e fragmentos de pelo coraram irregularmente de amarelo (Figura 21F). Quando aplicada a técnica da OSC, os pelos dos bovinos

intoxicados demonstraram uma redução expressiva na intensidade da coloração e foram identificados como estruturas coradas de rosa-claro, enquanto os pelos normais de bovinos controle se coraram de rosa-forte (Figuras 22A-D).

Nas hastes de pelos coletadas dos bovinos intoxicados espontaneamente e do Bovino 16 (experimental), e observadas em microscopia de luz polarizada, haviam alterações tanto morfológicas quanto no padrão de birrefringência. Quanto à morfologia, havia hastes de pelo com contornos irregulares (Figura 23A e B), tortuosas e onduladas (Figura 23C). Em alguns casos observou-se torção longitudinal do eixo da haste pilosa (Figura 23D). Em relação à birrefringência, os pelos afetados apresentaram polarização irregular (Figura 23E) ou ausente (Figura 23F) em algumas áreas, quando comparados aos pelos controle nos quais a polarização era uniforme.

No experimento realizado com o Bovino 16 foi demonstrado que nos cinco primeiros dias do experimento a taxa de crescimento dos pelos foi de aproximadamente 0,6 mm/dia (totalizando 3mm de pêlo que cresceu após o início da administração do cogumelo) e que a partir do 5º dia os pelos eram arrancados facilmente ao ser efetuada uma leve tração. Nesta etapa, notou-se que nas hastes pilosas havia apenas fragmentos de BRI aderidos. Nos dias 10 e 15 as medidas do comprimento dos pelos permaneceram inalteradas e neste período os fragmentos de BRI aderidos às hastes se tornaram mais escassos ou ausentes.

O exame da cutícula pilosa do Bovino 16, através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão com o uso da técnica de Swift, revelou marcada modificação na morfologia da exocutícula, porém, as alterações foram mínimas ou ausentes na camada A da exocutícula. Foi observada irregularidade da exocutícula e inclusões anormais de cistina no interior da endocutícula (Figuras 24A e B).

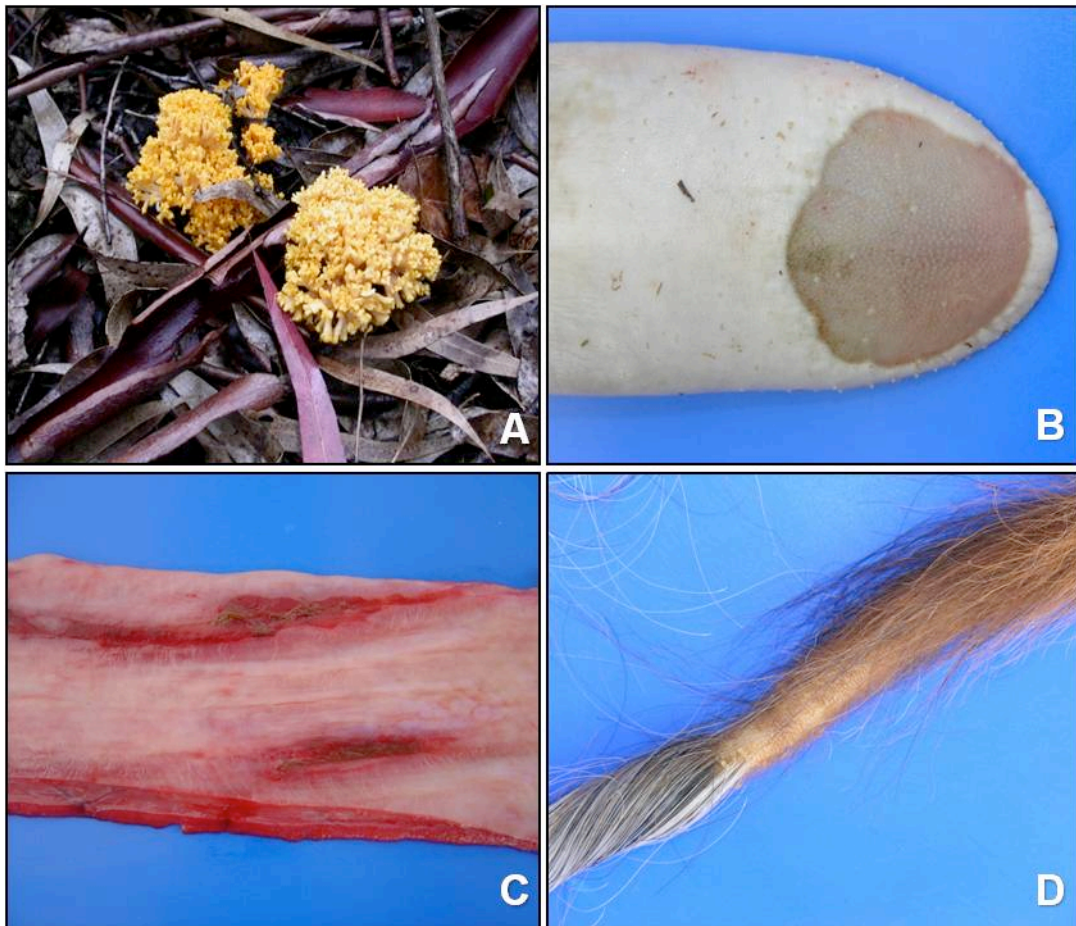


Figura 8 – A) Espécimes de *Ramaria flavo-brunnescens* encontradas no solo de bosque de eucalipto (propriedade onde ocorreu o surto B). B) Superfície dorsal, língua; Bovino 8. Observa-se que há uma área ulcerada e deprimida e que não há papilas filiformes. C) Esôfago; Bovino 5. A mucosa esofágica apresenta úlceras lineares multifocais. D) Cauda; Bovino 2. Há ausência de pelos da vassoura da cauda.

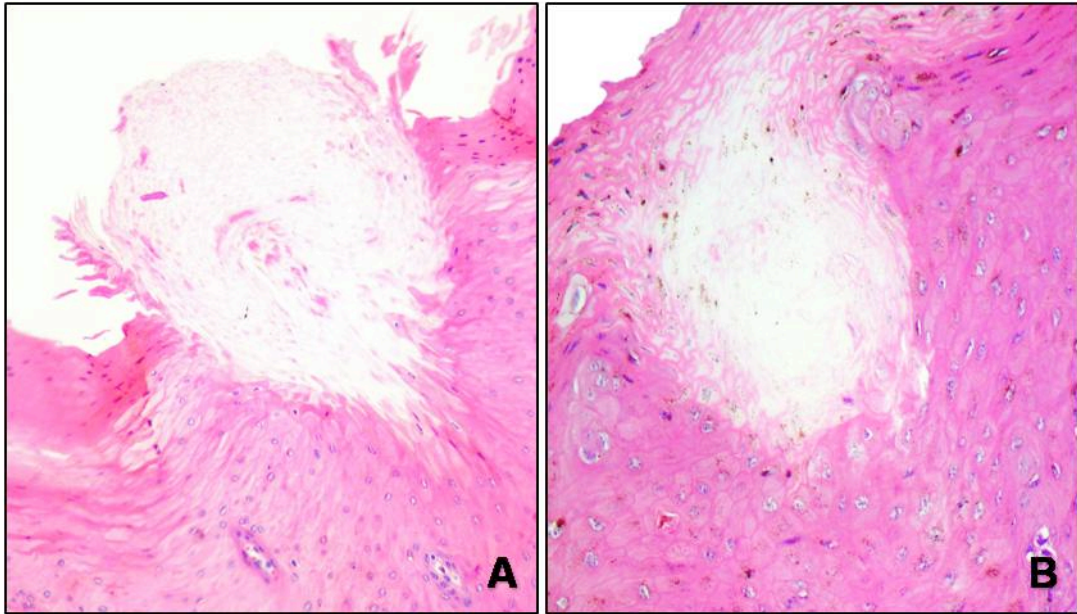


Figura 9 – Papila filiforme lingual. A) Papila normal, Bovino 10 (controle). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Papila atenuada, Bovino 6, HE, obj. 20x.

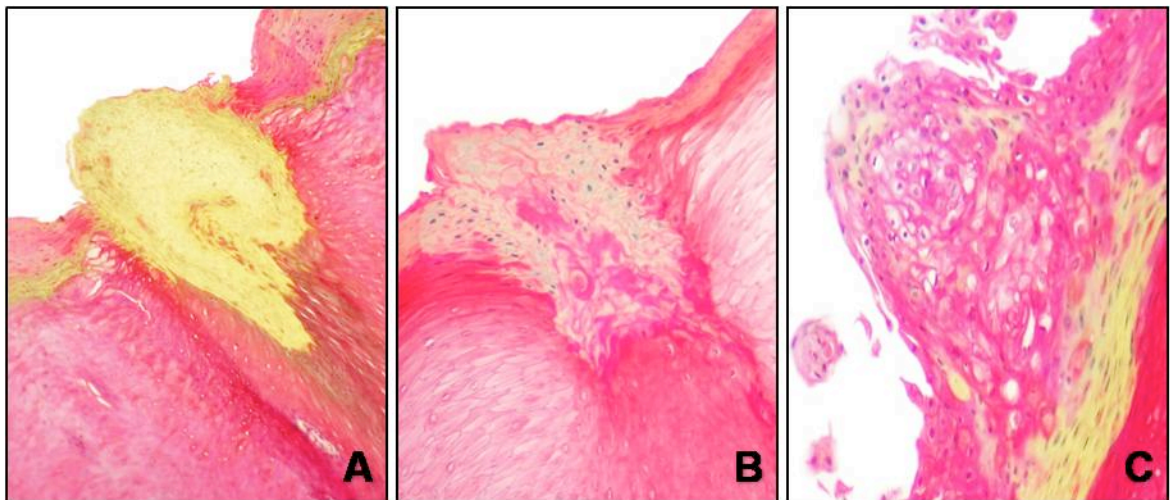


Figura 10 – Papila filiforme lingual. A) Papila normal, Bovino 10 (controle). Observa-se que a porção central da papila é corada de amarelo-brilhante, Tricrômico de Masson, obj. 20x. B) Papila atenuada, Bovino 6. A papila é menor, corada de amarelo menos intenso e há áreas centrais coradas em vermelho. Tricrômico de Masson (com ácido pícrico), obj. 20x. C) Papila degenerada, Bovino 13. Observa-se alteração na morfologia (vacuolização citoplasmática) e organização dos ceratinócitos da papila. Na área central, restam apenas pequenas áreas amarelo-claras, Tricrômico de Masson, obj. 20x.

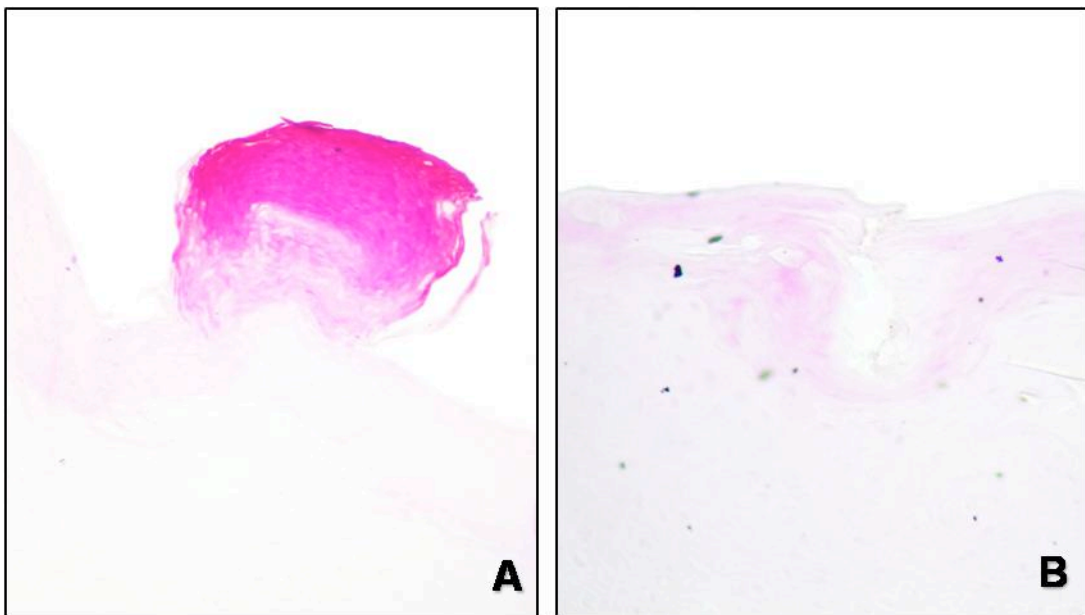


Figura 11 – Papila filiforme lingual. A) Papila normal, Bovino 10 (controle). Observa-se que a papila é corada de rosa-forte, Oxidação seletiva da ceratina (OSC), obj. 20x. B) Resquício de papila, Bovino 8. Observa-se que permanece apenas o resquício da estrutura que é corada de rosa-claro, OSC, obj. 20x.

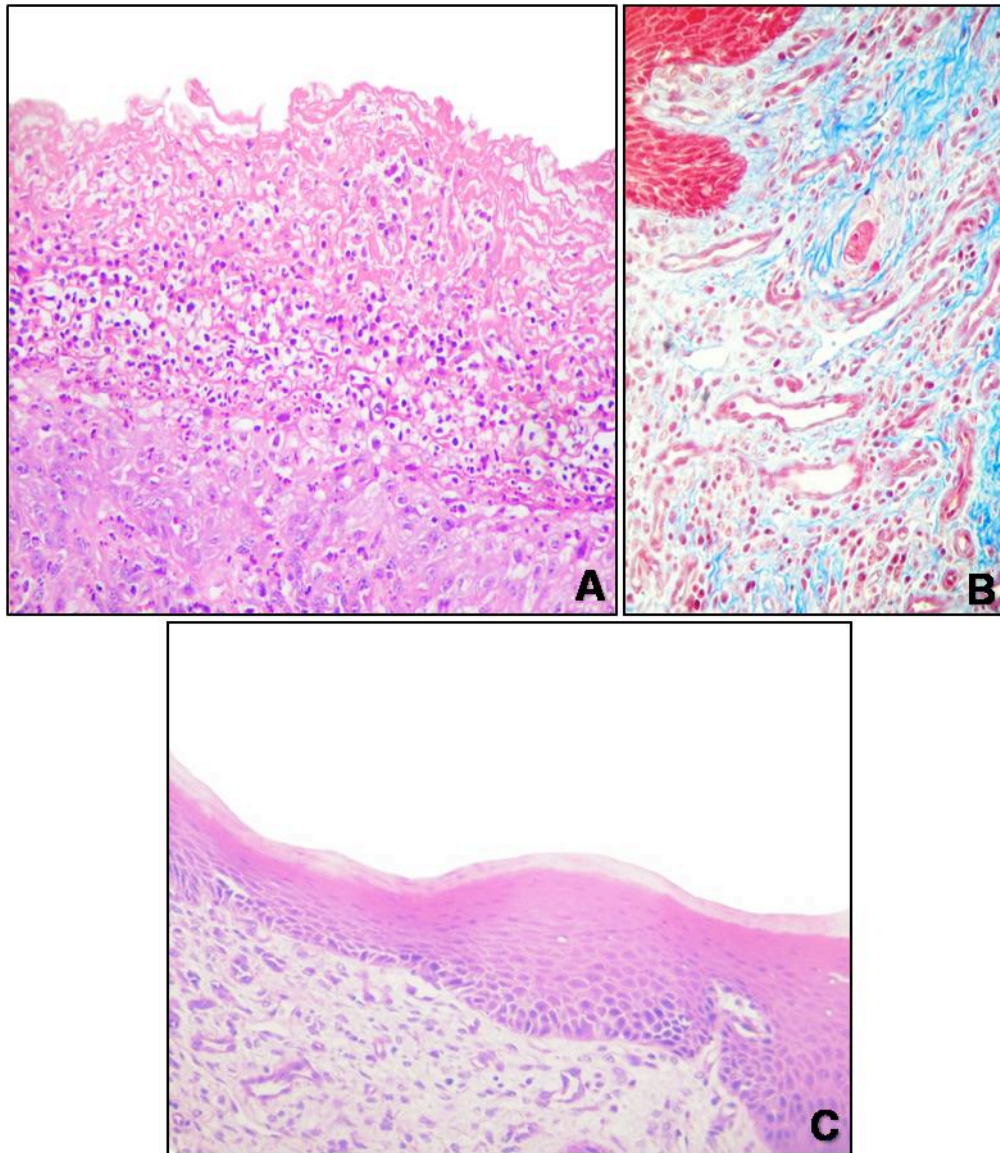


Figura 12– Superfície dorsal da língua. A) Observa-se área difusa de ulceração, Bovino 2, Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Tecido fibrovascular subjacente à região parcialmente ulcerada da superfície dorsal da língua, Bovino 9. Observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno (coradas em azul) e numeroso vasos neoformados (em vermelho), Tricrômico de Masson, obj. 40x. C) Epitélio dorsal, língua, Bovino 6. Observa-se área de re-epitelização caracterizada por um fino epitélio que recobre área de tecido fibrovascular, HE, obj. 4x.

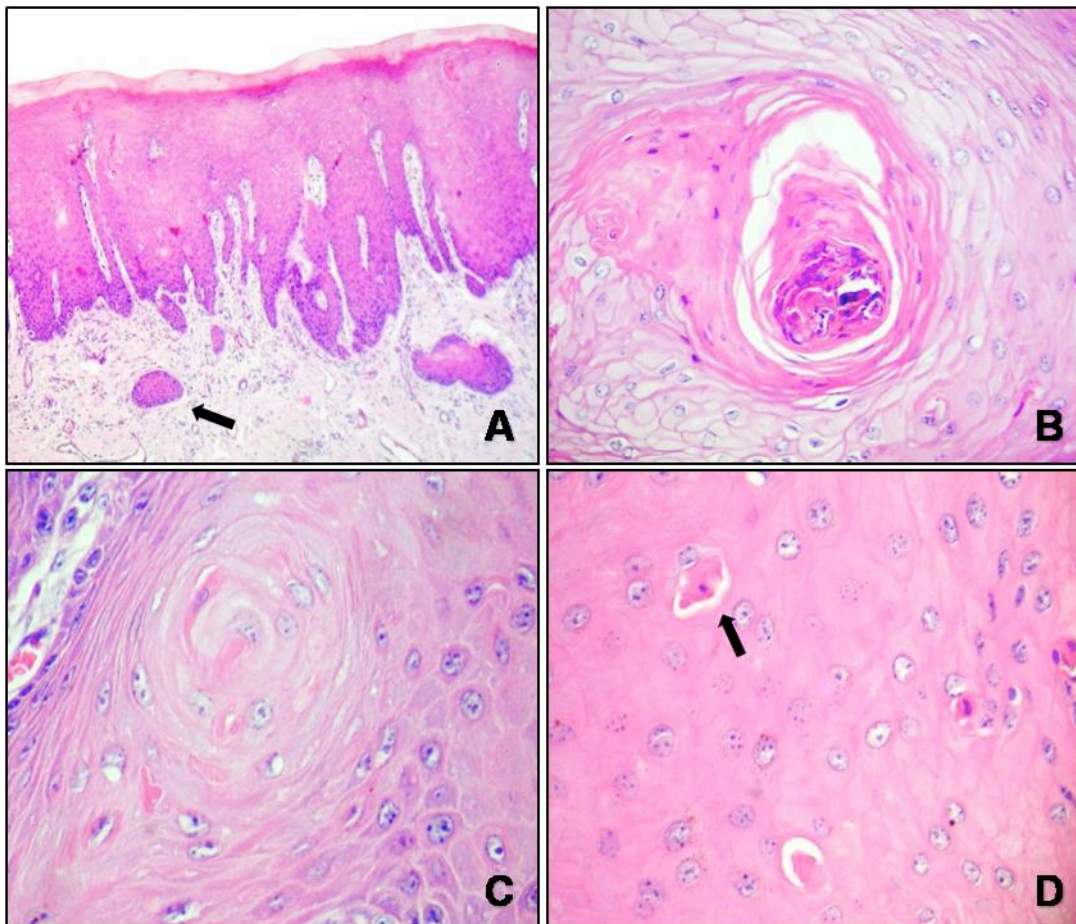


Figura 13– Epitélio dorsal lingual, Bovino 6, Hematoxilina-eosina. A) Há projeções irregulares do epitélio para a lâmina própria com ninhos desconectados do epitélio (seta). Obj. 10x. B) Observa-se perda da orientação normal dos ceratinócitos e formações concêntricas. Obj. 40x. C) Formação de ceratina lamelar concêntrica. Obj. 20x. D) Observa-se ceratinócitos circundados por halo claro, com citoplasma fortemente eosinofílico e núcleo pequeno e hiper cromático (seta). Obj. 40x.

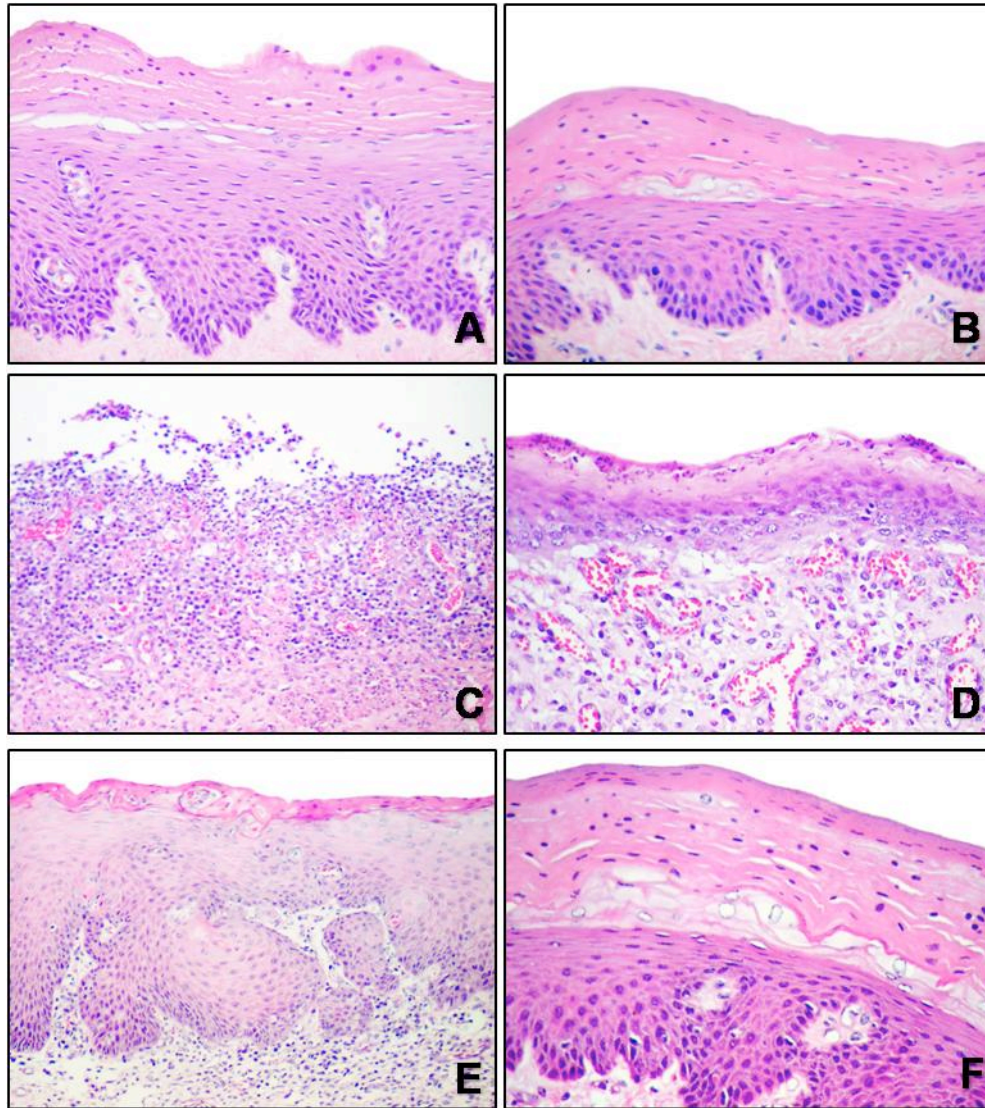


Figura 14 – Epitélio esofágico. Hematoxilina-eosina (HE). A) Epitélio normal, Bovino 10 (controle). Obj. 20x. B) Redução expressiva da espessura epitelial, Bovino 6. Obj. 20x. C) Ulceração acentuada, Bovino 4. Obj. 40x. D) Epitélio (re-epitelização) recobrimdo área de tecido fibrovascular, Bovino 5. Obj.40x. E) Projeções irregulares do epitélio para a lâmina própria, Bovino 3. Obj. 20x. F) Epitélio com ceratinócitos com morfologia alterada e vacuolização subcorneal, Bovino 6. Obj. 40x.

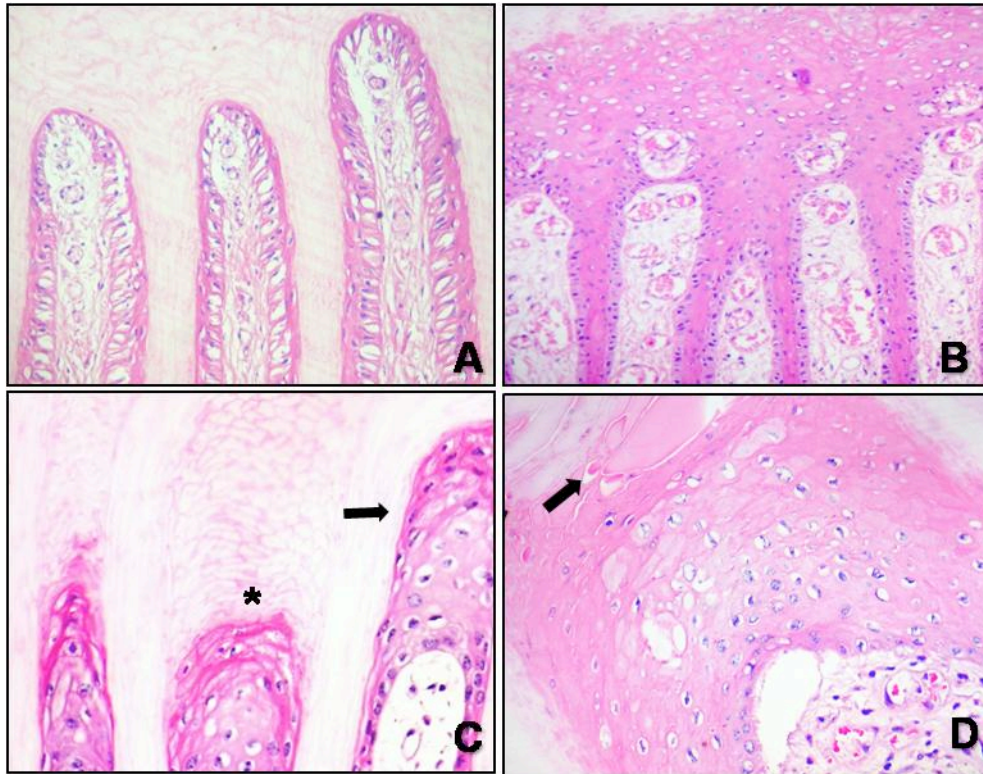


Figura 15 – Região laminar do casco. Hematoxilina-eosina (HE). A) Casco normal, Bovino 11 (controle). Obj. 20 x. B) Fusão do topo das lâminas epidérmicas, Bovino 6. Obj. 10x. C) Encurtamento (*) e maior número de camadas de células não-ceratinizadas no topo das lâminas (seta), Bovino 4. Obj. 20x. D) Vacuolização de ceratinócitos e acúmulos intracitoplasmáticos eosinofílicos (seta), Bovino 6. Obj. 40x.

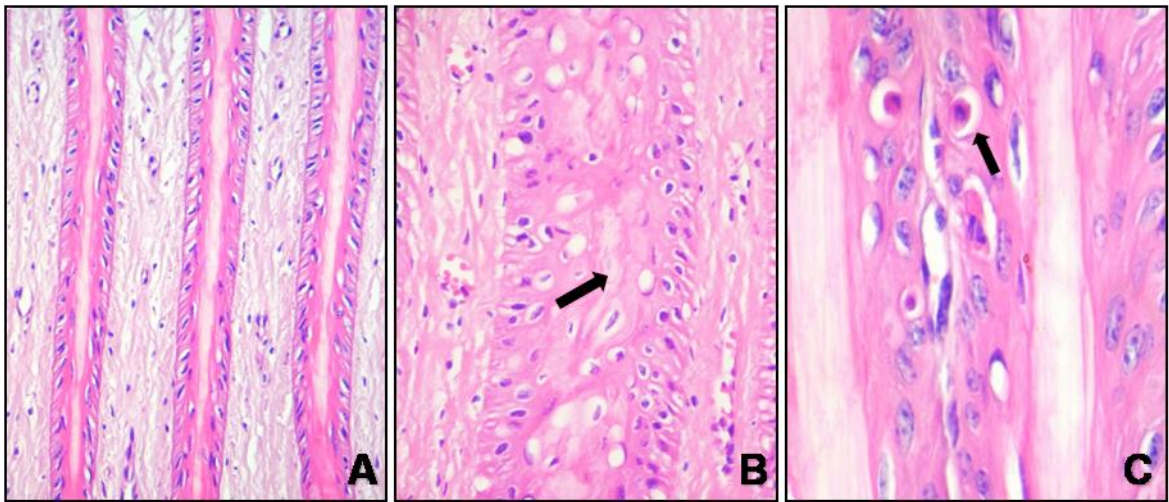


Figura 16 – Região laminar do casco. Hematoxilina-eosina (HE). A) Casco normal com ceratinização laminar central homogênea, Bovino 11 (controle). Obj. 10x. B) Desorganização na disposição dos ceratinócitos no epitélio laminar. Há várias camadas de ceratinócitos, muitos deles vacuolizados, ausência da ceratinização abrupta do centro da lâmina e persistência de núcleos na ceratina laminar (seta), Bovino 1. Obj. 20x. C) Ceratinização individual de células (seta), Bovino 5. Obj. 40x.

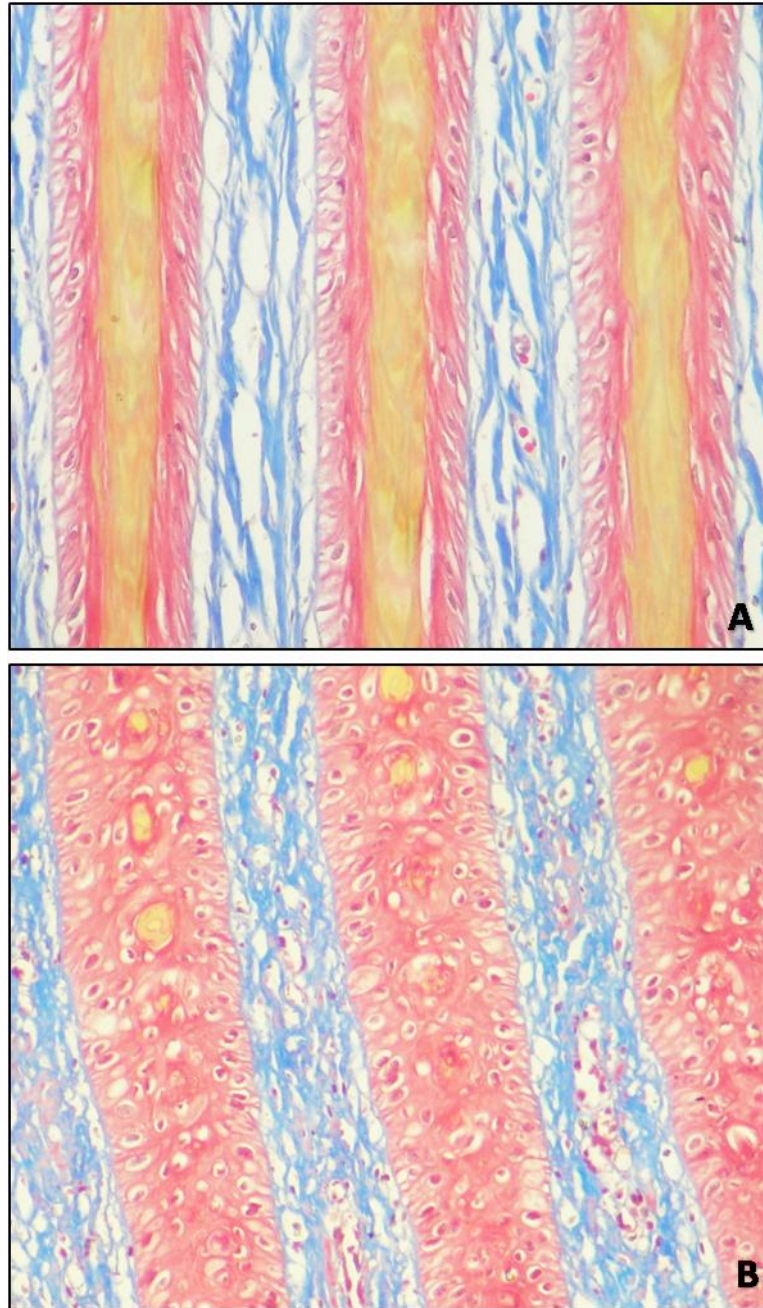


Figura 17– Região laminar do casco. Tricrômico de Masson. A) Epitélio laminar normal, Bovino 11 (controle). Observa-se a ceratina laminar contínua corada em amarelo. Obj. 20x. B) Fragmentos de ceratina laminar são observados em amarelo, Bovino, 1. Obj. 20x.

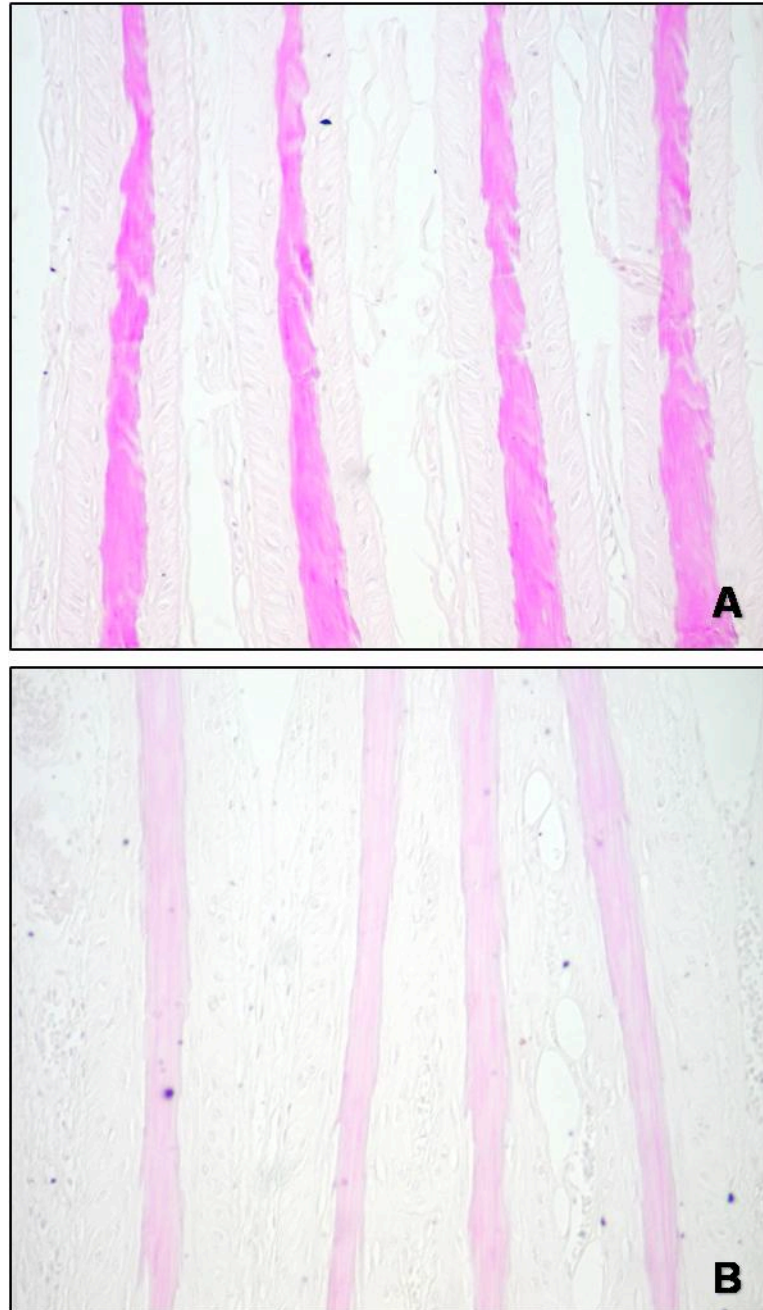


Figura 18 – Região laminar do casco. Técnica da oxidação seletiva da ceratina (OSC). A) Ceratina laminar normal, Bovino 11 (controle). A ceratina é corada homogeneamente de rosa-forte. Obj. 20x. B) Ceratina laminar defeituosa, Bovino 5. A ceratina é corada de rosa-claro. Obj. 20x.

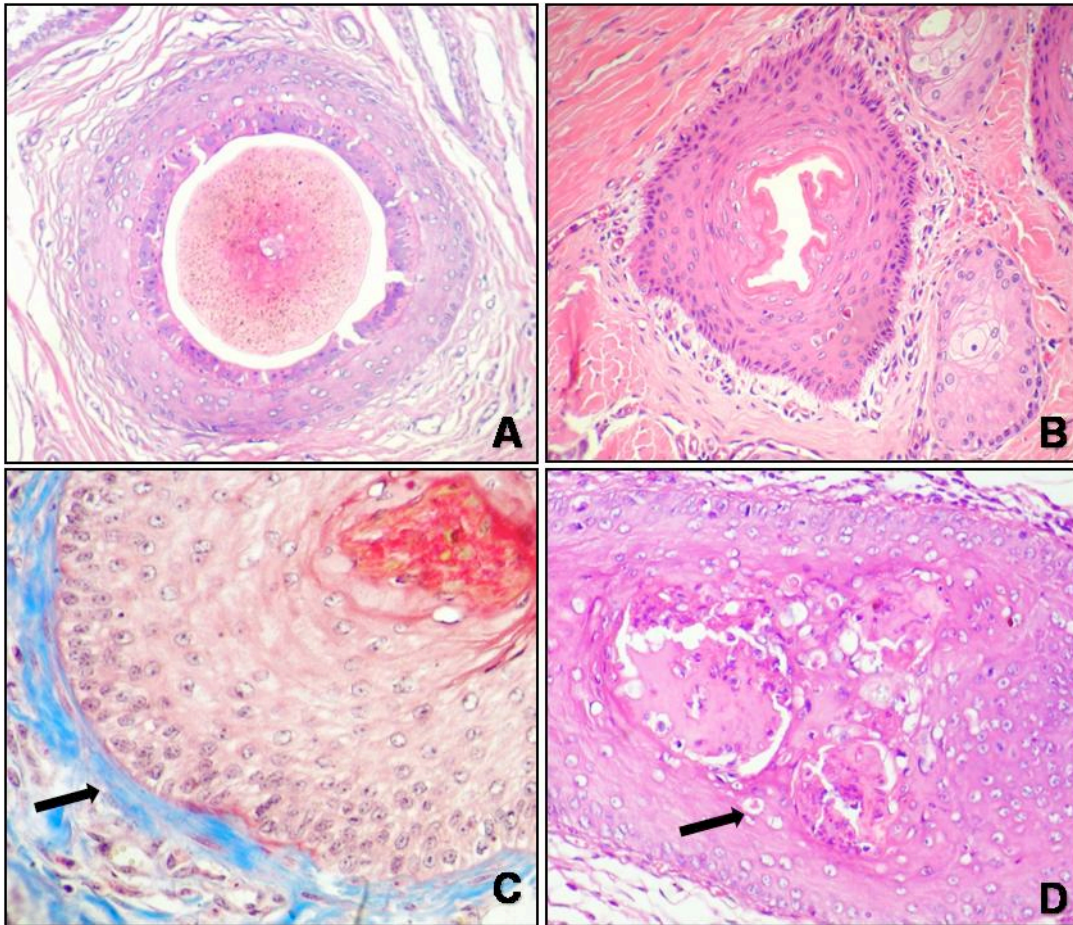


Figura 19 – Folículos pilosos da pele da região da vassoura da cauda. A) Folículo piloso e pelo normais, Bovino 12 (controle). Hematoxilina-eosina (HE), obj 20x. B) Folículo piloso com contornos internos e externos irregulares, Bovino 9. HE Obj. 20x. C) Há desorganização das células da bainha radicular externa e espessamento da bainha radicular fibrosa (seta), Bovino 9. Tricrômico de Masson, obj. 20x. D) Espessamento da bainha radicular externa. Há numerosos ceratinócitos disqueratóticos (seta) na bainha radicular externa e haste pilosa desintegrada na área central, Bovino 9. HE, Obj 20x.

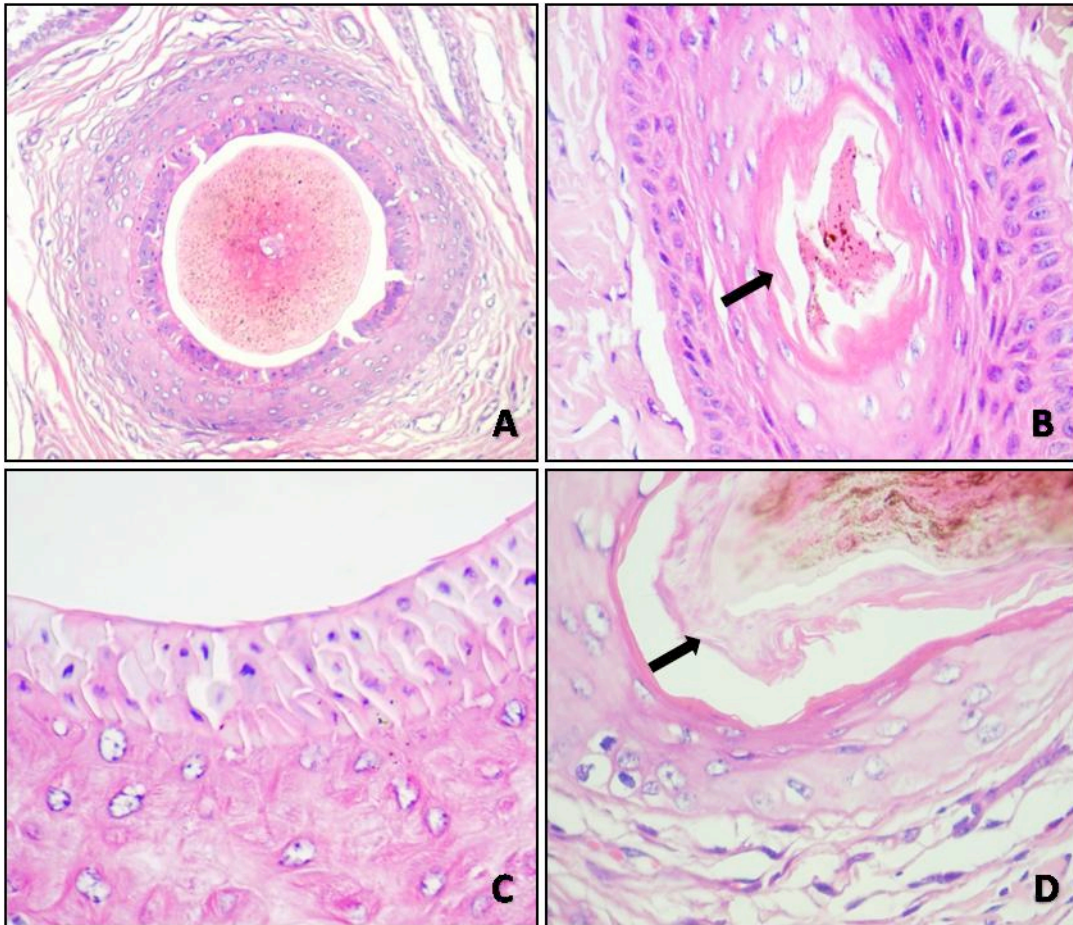


Figura 20 – Folículos pilosos da pele da região da vassoura da cauda. Hematoxilina-eosina (HE). A) Folículo piloso e pelo normais, Bovino 12 (controle). Obj. 10x. B) Folículo com bainha radicular interna (BRI) desintegrada. Há um pelo degenerado no centro do folículo (seta), Bovino 1. Obj. 20x. C) BRI de folículo piloso normal em maior detalhe, Bovino 12 (controle). Obj. 40x. D) BRI degenerada (seta) e desprendimento da bainha radicular externa, Bovino 1. Obj. 40x.

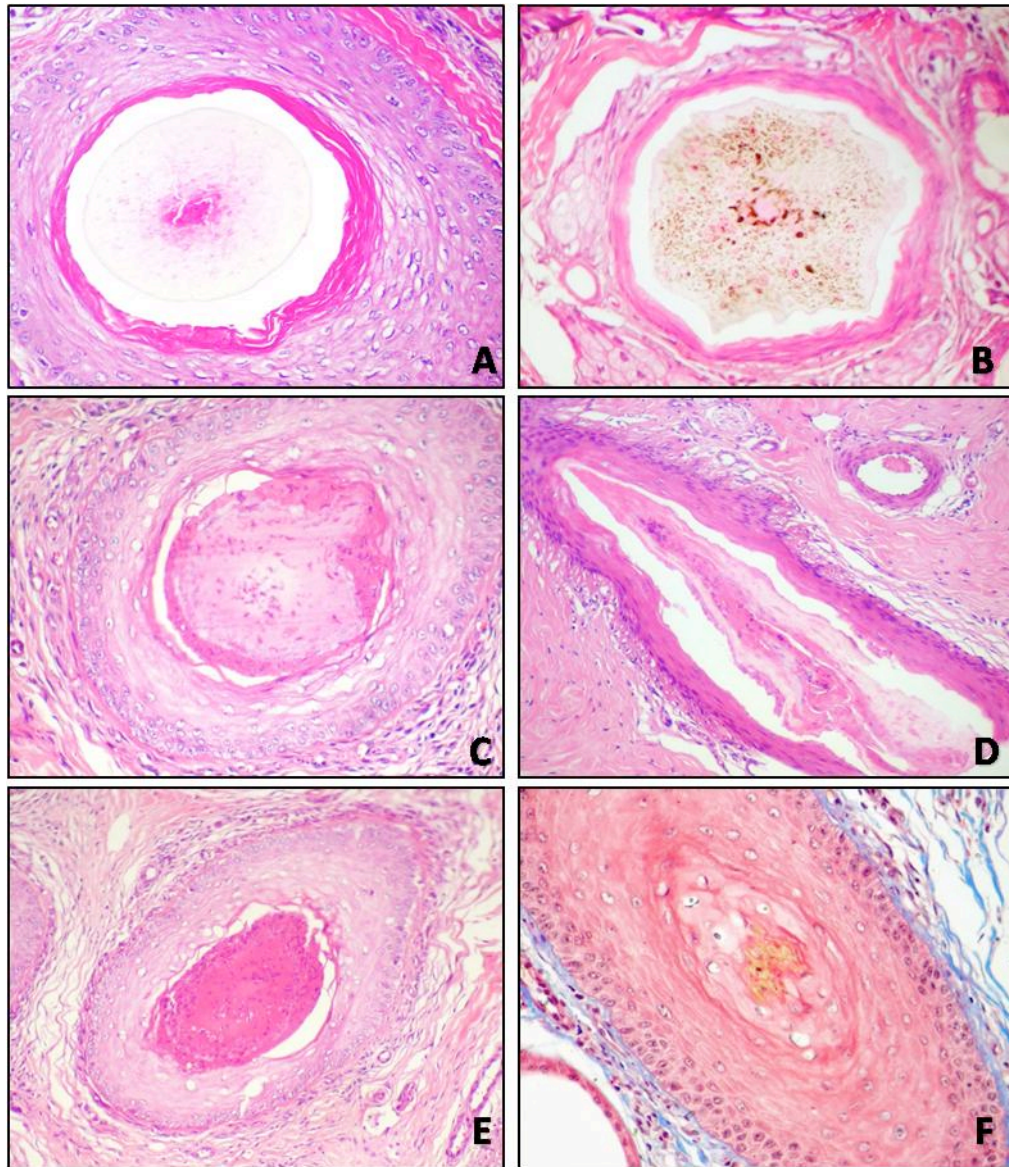


Figura 21 – Pelos da pele da região da vassoura da cauda. A) Folículo piloso e pelo normais, Bovino 12 (controle). Hematoxilina-eosina (HE), obj. 20x. B) Pelo com contorno irregular, Bovino 13. HE, obj. 20x. C, D e E) Pelos com contornos irregulares, extremamente tortuosos e desintegrados, Bovino 8, HE, obj. 40x, 20x e 20x respectivamente. F) Alteração pilosa acentuada. Apenas um pequeno fragmento de pelo degenerado está corado em amarelo. Tricrômico de Masson, obj. 40x.

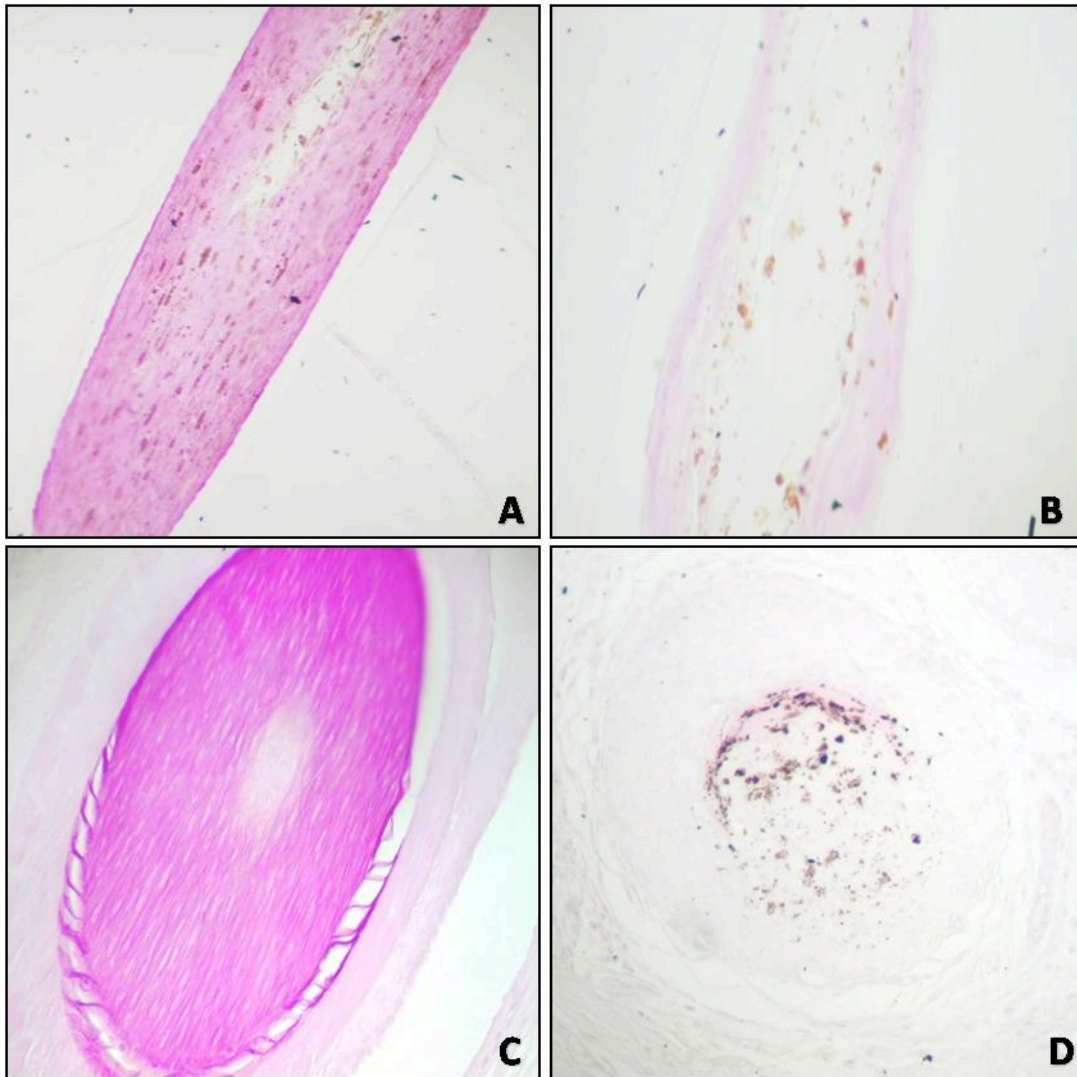


Figura 22 – Folículos pilosos e pelos da pele da região da vassoura da cauda. Técnica da oxidação seletiva da ceratina (OSC). A) Corte longitudinal de pelo normal, Bovino 12 (controle). O pelo é homogeneamente corado de rosa-forte. Obj. 20x. B) Corte longitudinal de pelo, Bovino 8. O pelo é degenerado e apenas algumas porções são coradas de rosa-claro. Obj, 20x. C) Corte transversal de pelo normal, Bovino 12 (controle). O pelo é homogeneamente corado de rosa-forte. Obj, 40x. Corte transversal de pelo, Bovino 8. Há restos de pelo corados de rosa claro. Obj. 20x.

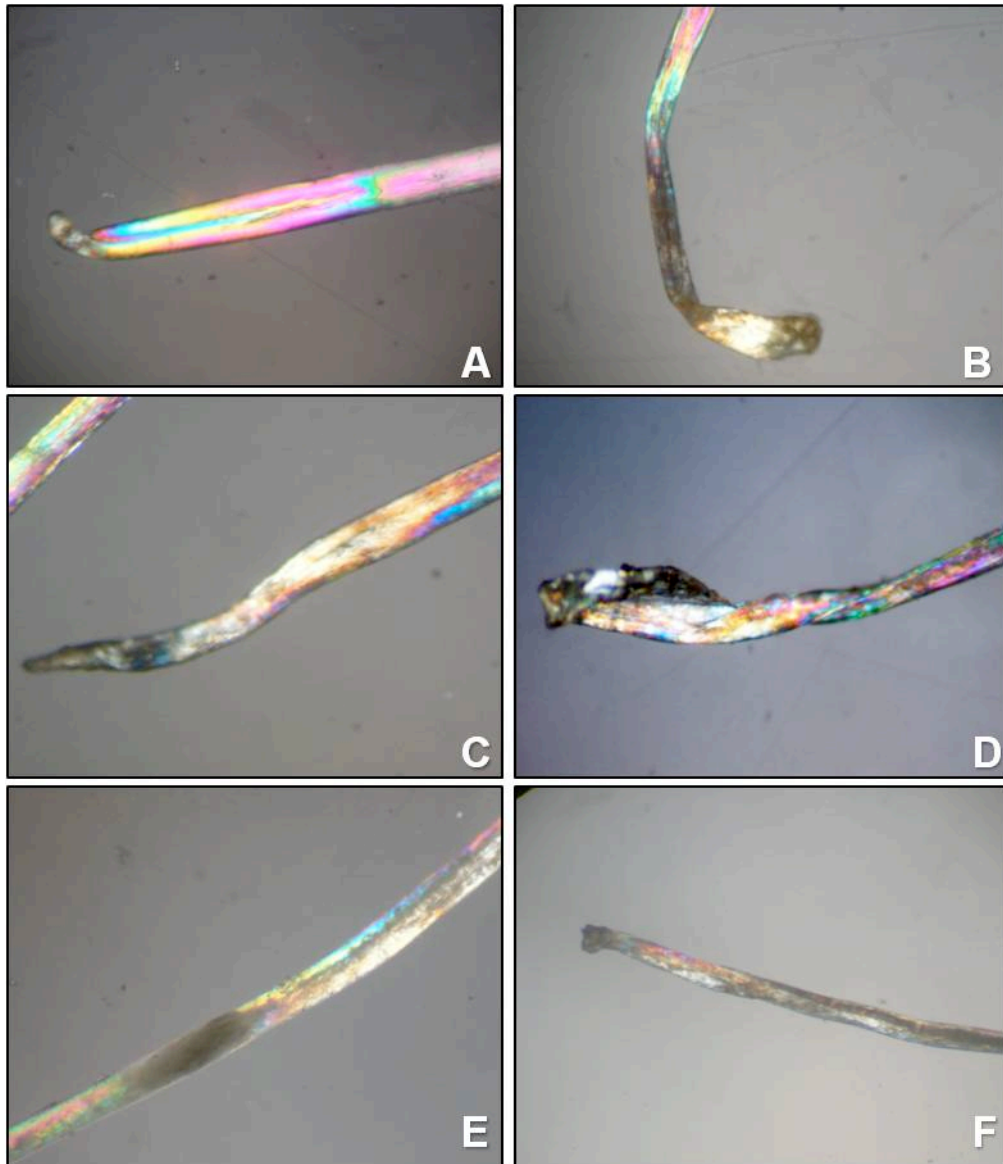


Figura 23 – Alterações nas hastes pilosas de bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens*. Exame polaroscópico. Obj. 20x. A) Haste pilosa normal do Bovino 16 no dia 0. Observa-se que a haste tem contornos e diâmetro regulares; além disso, há uma variação gradual nas cores. B) Haste pilosa com área achatada sem polarização. Bovino 7. C) Haste pilosa tortuosa e ondulada. Bovino 16, dia 5. D) Haste pilosa com torção longitudinal do eixo. Bovino 16, dia 5. E) Haste pilosa com polarização irregular; nota-se um segmento escuro e opaco. Bovino 16, dia 10. F) Haste pilosa com polarização ausente em segmento extenso. Bovino 16, dia 10.

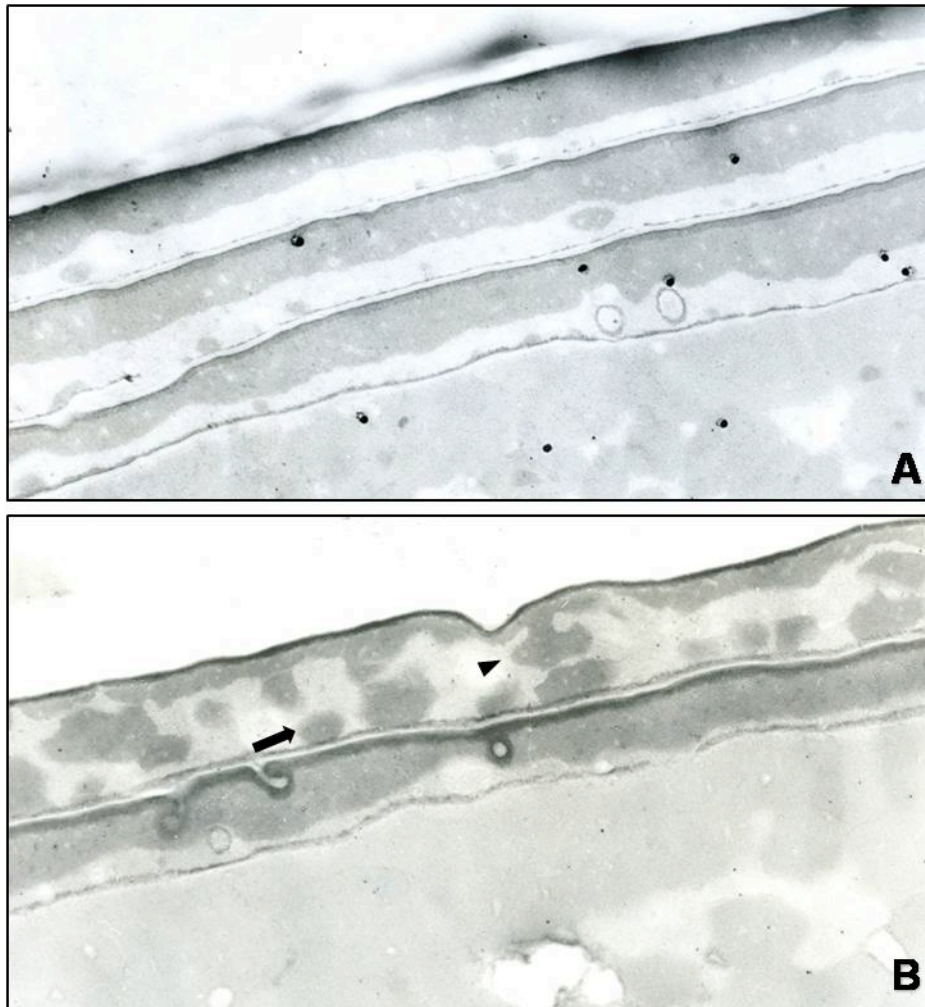


Figura 24 - Fotomicrografia eletrônica das células cuticulares pilosas dos pelos da vassoura da cauda do Bovino 16 intoxicado experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens*. A) Dia 0. As células cuticulares não apresentam alterações. Aumento de 30.000 x. B) Dia 15. Observa-se acentuada irregularidade da exocutícula (cabeça de seta), com inclusões cistina-positivas, arredondadas ou irregulares (seta) na endocutícula. Aumento de 37.500 x.

4.2 Discussão

Alguns estudos têm descrito as alterações macroscópicas e microscópicas na intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em animais domésticos, porém poucos trabalhos tiveram também como objetivo investigar (KOMMERS; SANTOS, 1995; SALLIS et al., 2000; SCHONS et al., 2007) ou discutir (BARROS et al., 2006) a patogênese das lesões.

Neste estudo, a patogênese da intoxicação foi investigada através da revisão de casos espontâneos e experimentais pela histopatologia e por métodos auxiliares na avaliação de defeitos da ceratinização na língua, esôfago, casco e cauda. Nos tecidos examinados foram observados diferentes graus e estágios de lesões, o que é especialmente útil quando se tem o objetivo de traçar a dinâmica das alterações provocadas por *R. flavo-brunnescens*. Nos bovinos intoxicados experimentalmente, as lesões foram mais brandas, quando comparadas às presentes nos casos espontâneos. Observação semelhante havia sido feita anteriormente (KOMMERS; SANTOS, 1995). Explicações para esta diferença na intensidade das lesões estão provavelmente relacionadas com as características de termolabilidade e volatilidade relatadas para o princípio tóxico (BAUER et al., 1966; FIDALGO; FIDALGO, 1970; KOMMERS, 1993; SALLIS et al., 2004). Foram observadas variações na toxicidade do cogumelo em diferentes anos nos mesmos locais (SALLIS et al., 2000), bem como diferenças na toxicidade do cogumelo após períodos intensamente chuvosos. Possíveis diferenças na suscetibilidade individual dos animais intoxicados também têm sido aventadas (SCHONS et al., 2007).

Na língua, a grande maioria das lesões histopatológicas observadas demonstrou defeitos na ceratinização tais como desaparecimento das papilas filiformes, adelgaçamento, estratificação irregular, ceratinização lamelar focal e ceratinização individual de células (disceratose) no epitélio de revestimento dorsal.

As alterações relacionadas à ceratinização das papilas filiformes da língua dos bovinos deste estudo, estruturas que normalmente sofrem ceratinização dura (BANKS, 1991), puderam ser melhor observadas através da técnica do Tricrômico de Masson. Ao utilizar a técnica do Tricrômico de Masson nas línguas controle deste estudo, observou-se que a ceratina mole corava em vermelho e que a ceratina dura das papilas filiformes corava em amarelo. A mesma coloração amarela foi observada na ceratina dura do casco e nos pelos da cauda dos bovinos controles. Desta forma, além de ter sido uma ferramenta muito útil para

diferenciar os tipos de ceratina, os defeitos na ceratinização dura também puderam ser melhor caracterizados. A coloração amarela das estruturas que sofrem ceratinização dura está provavelmente relacionada com a presença do ácido pícrico no protocolo de Tricrômico de Masson utilizado, pois as substâncias cornificadas demonstram grande afinidade por esse ácido (FERNANDES, 1949). É importante lembrar que nem sempre o ácido pícrico está presente nas variações da técnica do Tricrômico de Masson, sendo somente descrita a ceratina como corada em vermelho por esta técnica, quando o ácido pícrico não estava presente entre os reagentes dos protocolos (BEHMER et al., 1976; PROPHET et al., 1992). Com o uso desta técnica ficou evidente que nas papilas filiformes remanescentes há desestruturação e menor quantidade de ceratina dura.

Quando a técnica da oxidação seletiva da ceratina (OSC), a qual revela o conteúdo de cistina, principalmente na ceratina dura onde este é maior (PEARSE, 1951; LILIE; BANGLE, 1954), foi aplicada às papilas filiformes linguais, a intensidade da coloração foi muito fraca, ficando evidente que há um baixo conteúdo de cistina na ceratina dura das papilas filiformes dos bovinos intoxicados.

Quanto à espessura epitelial, houve redução em todas as línguas e esôfagos analisados, no entanto essa redução foi mais marcada nos bovinos intoxicados espontaneamente, quando comparada aos bovinos intoxicados experimentalmente neste estudo. O adelgaçamento na espessura do epitélio lingual havia sido descrito na intoxicação espontânea (BARROS et al., 2006) e na experimental (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007). Entretanto, o adelgaçamento na espessura do epitélio esofágico, visto em todos os bovinos deste estudo, não havia sido relatado na literatura consultada. Chamou a atenção o fato de que a redução na espessura do epitélio foi mais dramática nas áreas adjacentes às úlceras, especialmente no epitélio lingual. O atrito ao epitélio lesado e a infecção bacteriana secundária possivelmente contribuem para o desenvolvimento das úlceras.

Algumas explicações têm sido propostas para justificar o adelgaçamento epitelial lingual. Por um lado pensou-se na possibilidade de uma interferência na multiplicação dos ceratinócitos linguais (KOMMERS; SANTOS, 1995). A base para esta possibilidade seria que análises do ciclo celular revelaram que a cist(e)ina estimula a proliferação celular em várias células (BOURNE, 1960; NODA et al., 2002). Como acredita-se que haja interferência no metabolismo deste aminoácido na intoxicação por *R. flavo-brunnescens* (KOMMERS; SANTOS, 1995), como será discutido posteriormente, essa possibilidade permanece plausível. Schons et al. (2007) tentaram confirmar esta teoria através de imunomarcagem com Ki-67 (uma proteína que detecta células em proliferação), porém seus resultados foram

inconclusivos devido ao reduzido número de amostras analisadas. Por outro lado foi discutida também a possibilidade de que haveria um marcado desgaste epitelial relacionado às alterações degenerativas observadas no epitélio dorsal da língua (SCHONS et al., 2007). Essa hipótese, também plausível, está baseada em achados de microscopia eletrônica (BARROS, 2005; SCHONS et al., 2007), nos quais observou-se diminuição nos tonofilamentos dos ceratinócitos da camada espinhosa, talvez contribuindo para o aumento dos espaços intercelulares, facilitando uma diminuição da adesão entre os ceratinócitos com posterior desprendimento dos mesmos (SCHONS et al., 2007).

O tipo de avaliação morfológica realizada neste estudo confirmou a ocorrência do adelgaçamento epitelial lingual, porém não contribuiu para determinar sua origem. Alterações como estratificação irregular do epitélio associadas à ceratinização individual de células ou de pequenos grupos de ceratinócitos no epitélio oral podem indicar distúrbios na maturação celular (MORGAN, 1992). Da mesma forma, a presença de grande número de ceratinócitos disceratóticos também é associada a alterações no processo de ceratinização, uma vez que é um achado indicativo de defeito na diferenciação epitelial (YAGER; WILCOCK, 1994).

Na intoxicação espontânea pelo cogumelo, tem sido relatada a hiperemia do rodete coronário, podendo ocorrer perda do revestimento córneo dos cascos (SANTOS, 1993). Nos casos experimentais as lesões macroscópicas geralmente limitaram-se à hiperemia do rodete coronário (KOMMERS; SANTOS, 1995) ou não havia alterações (SCHONS, et al., 2007). Nos cascos dos bovinos aqui estudados havia somente alterações histológicas, observadas no estrato laminar. Estas caracterizavam-se por graus variáveis de fusão, encurtamento, múltiplas camadas de células não-ceratinizadas no topo, ceratinização irregular e descontínua com persistência de núcleos, ceratinização individual e vacuolização de ceratinócitos das lâminas epidérmicas. Todas estas alterações revelam defeitos na ceratinização, os quais foram confirmados pelas técnicas de Tricrômico de Masson e OSC, conforme discutido para a língua.

Uma das alterações mais consistentemente observadas tanto nos casos espontâneos (BARROS et al., 2006) como nos experimentais foi o afrouxamento e queda dos pelos da vassoura da cauda (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007), constituindo-se num dos achados mais característicos desta intoxicação. Lesões semelhantes as da intoxicação pelo cogumelo, principalmente as que envolvem a cauda e o casco, foram descritas na intoxicação crônica por selênio (*alkali disease*) em bovinos (O'TOOLE; RAISBECK, 1995). As lesões descritas no bulbo de bovinos intoxicados pelo cogumelo (BARROS et al., 2006) assemelham-se às relatadas na medula espinhal de suínos (CASTEEL, et al., 1985). Nas

análises publicadas até o momento, não foram observados níveis tóxicos de selênio no cogumelo (FREITAS et al., 1966) nem em tecidos de animais intoxicados (BAUER et al., 1966). Vale salientar que essas análises do conteúdo de selênio foram realizadas há mais de 40 anos.

Em seções histológicas da região da vassoura da cauda dos bovinos deste estudo, as alterações puderam ser divididas, em lesões na parede folicular (bainhas radicular externa [BRE] e interna [BRI]) e naquelas que envolveram os pelos propriamente ditos. As alterações observadas no epitélio folicular, como desorganização e desalinhamento das células da BRE, à semelhança do que é visto no epitélio lingual, podem indicar distúrbios na maturação celular (MORGAN, 1992). Da mesma forma, a presença de grande número de células disceratóticas indica defeito na diferenciação epitelial (MARUYAMA et al., 1994). Alterações foliculares (telogenização, ceratinização, disceratose) semelhantes às descritas nos bovinos deste estudo também foram relatadas na *alkali disease* (AD) em bovinos (O'TOOLE; RAISBECK, 1995). Na patogênese proposta para a AD, devido à semelhança química entre o selênio (Se) e o enxofre (S), acredita-se que as lesões epiteliais resultem da substituição do S pelo Se nos resíduos de cisteína nas proteínas ricas em enxofre, com conseqüente enfraquecimento das ligações dissulfeto (TRAUB-DARGATZ et al., 1986; O'TOOLE; RAISBECK, 1995).

Numa análise comparativa das lesões foliculares com as pilosas, observaram-se indícios de que as duas se sobrepõe, de forma que as alterações na morfologia do pelo possam ser resultantes tanto de defeitos no próprio pelo quanto decorrentes de uma parede folicular defeituosa, que modela em seu interior um pelo deformado. Numa alteração rara em humanos conhecida como *pili torti*, irregularidades da estrutura da BRE podem ter como conseqüências deformidades sequenciais da BRI e do pelo, que dependendo do nível folicular não estão totalmente ceratinizados (MARUYAMA et al.; 1994).

Nas seções histológicas, as principais alterações nas hastes pilosas demonstraram contornos irregulares, tortuosidade e desintegração da haste. Nas hastes pilosas desintegradas foi possível identificar, pela técnica do Tricrômico de Masson, somente fragmentos de hastes pilosas coradas em amarelo, indicando ceratinização dura defeituosa. Pela técnica da OSC, observou-se redução expressiva na coloração das hastes, confirmando a redução na quantidade de cistina, como descrita para as papilas filiformes e para as lâminas epidérmicas do casco.

O exame polaroscópico tem sido utilizado para identificar importantes alterações nas hastes pilosas, especialmente em doenças de humanos (ITIN et al., 2001; SPERLING; DiGIOVANNA, 2003). Vale salientar que na grande maioria destas doenças toda a haste

pilosa está afetada, pois muitas delas refletem defeitos congênitos no processo de ceratinização. Para investigar possíveis defeitos na haste pilosa de bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* fez-se necessário determinar a taxa aproximada de crescimento diário das hastes pilosas, especialmente em torno do quinto dia de intoxicação, quando é melhor detectado o afrouxamento dos pelos longos da vassoura da cauda (KOMMERS; SANTOS, 1995; SCHONS et al., 2007). Através do tingimento dos pelos da vassoura da cauda pôde-se determinar que cerca de 3mm de pelo cresceram após a administração do cogumelo, dando uma indicação de que as alterações observadas nesta porção estariam sob influência dos princípios tóxicos do mesmo. Isto permitiu não somente a avaliação da área afetada através do exame polaroscópico dos pelos do Bovino 16, como dos pelos de vários bovinos intoxicados espontaneamente. É importante salientar que houve parada do crescimento dos pelos entre o 5° e 15° dias do experimento com o Bovino 16, talvez refletindo a deficiência de cistina na replicação das células da matriz pilosa (NODA et al., 2002), como discutido para a língua.

O exame polaroscópico dos pelos (colhidos no exame clínico ou na necropsia) permitiu uma boa identificação das alterações morfológicas e, adicionalmente, das alterações no padrão de birrefringência dos pelos. Muitas alterações morfológicas observadas nos pelos dos bovinos deste estudo foram semelhantes a condições que envolvem algum tipo de defeito relacionado à ceratinização descrita em humanos. Dentre elas destacam-se ondulação, achatamento e torção de hastes (MASAAKI et al., 1984; MARUYAMA et al., 1994; PEREIRA, 1997; WEEDON, 2002; WHITING; DY, 2006).

O pelo normal tem fibras ceratinizadas paralelas ao longo da haste e quando examinado sob luz polarizada mostra variação gradual de cores ao longo de todo o seu comprimento (SPERLING; DiGIOVANNA, 2003). Cabelos de pacientes humanos com tricotiodistrofia (TTD), uma doença congênita na qual há quantidade reduzida de proteínas ricas em cistina, causando fraqueza estrutural da haste pilosa, exibem bandas escuras e claras, alternadas ao longo de toda a haste no exame polaroscópico (ITIN et al., 2001). Não se sabe se esse fenômeno ocorre devido a formação anormal das fibras de ceratina ou se os tonofilamentos estão alinhados em padrão anormal (SPERLING; DiGIOVANNA, 2003).

Nos pelos dos bovinos intoxicados por *R. flavo-brunnescens* as alterações no padrão de birrefringência (segmentos com ausência de polarização) são observadas nas áreas suprabulbares, correspondendo à porção do pelo que cresceu sob influência do princípio tóxico do cogumelo, e provavelmente refletem a redução do aminoácido cistina detectada nos pelos pela técnica da OSC nas seções histológicas da cauda.

O exame da cutícula pilosa do Bovino 16, através da microscopia eletrônica de transmissão com o uso da técnica de Swift, revelou marcada modificação na morfologia da exocutícula, porém, as alterações foram mínimas ou ausentes na camada A da exocutícula. Foi observada irregularidade da exocutícula e inclusões anormais de cistina no interior da endocutícula. A técnica de Swift (metenamina-nitrato de prata amoniacal), sob microscopia eletrônica de transmissão, é considerada como um método histoquímico específico para a detecção do S presente no aminoácido cistina, havendo uma correlação estequiométrica positiva entre a intensidade da coloração e a concentração de S presente (SWIFT, 1967). Na cutícula de cabelos tricotodistóficos, as camadas A e a exocutícula podem estar ausentes ou descontínuas e glóbulos de material eletrodense (inclusões cistina-positivas anormais) podem ser identificados na camada A e no interior da endocutícula (GUMMER et al., 1984; KHUMALO et al., 2005), como vistas na endocutícula do Bovino 16. Apesar de não terem sido observadas alterações na camada A da exocutícula no Bovino 16, as demais alterações são muito semelhantes às vistas na TTD, permitindo mais uma vez inferir que as alterações pilosas vistas na intoxicação pelo cogumelo estão relacionadas a um baixo conteúdo de cistina.

Em todos os tecidos avaliados não foram observadas lesões que corroborem com a patogênese proposta para a intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em ovinos, onde a doença foi comparada ao ergotismo (SALLIS et al., 2000).

Todas as alterações observadas nas estruturas ceratinizadas estudadas, mas especialmente nas que sofrem ceratinização dura, revelaram múltiplos defeitos na ceratinização. Aliando ao estudo morfológico os resultados obtidos através da técnica da OSC e da microscopia eletrônica/técnica de Swift pode-se associar os defeitos na ceratinização a uma redução na quantidade de aminoácidos sulfurados (cisteína/cistina) com resultante enfraquecimento da estrutura molecular da ceratina dura.

5 CONCLUSÕES

1. A patogênese das lesões epiteliais na intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos envolve distúrbios na ceratinização mole e dura (principalmente), ligados possivelmente à proliferação, diferenciação e maturação de ceratinócitos, induzidos por marcada redução na cistina.
2. As ulcerações observadas na língua e esôfago devem-se ao epiteliotropismo do princípio tóxico do cogumelo, com conseqüente adelgaçamento do epitélio de revestimento e ulcerações pelo atrito e infecção bacteriana secundária.

REFERÊNCIAS

BACHA JR, W. J.; WOOD, L. M. Integument. In: _____ **Color atlas of veterinary histology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. cap. 12, p. 81-109.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. 629 p.

BARROS, R. R. **Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae)**. 2005. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BARROS, R. R. et al. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro. v. 26, n. 2, p. 87-96, 2006.

BAUER, A. G.; LARANJA, R. J.; SANTOS, A. G. Sobre a etiologia do chamado “Mal do Eucalipto”. **Arqs Inst. Vet. Desidério Finamor**, v. 3, p. 85-90, 1966.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART, 1976. 241 p.

BERTRAM, J. E. A.; GOSLINE, J. M. Functional design of horse hoof keratin: the modulation of mechanical properties through hydration effects. **J. Exp. Biol.**, Cambridge. v. 130, n. x, p. 121-136, 1987.

BOURNE, G. An introduction to functional histology. Boston: Little and Brown, 1960, 196p.

CASTEEL S. W., et al. Selenium toxicosis in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Tampa. v. 186, p. 1084-1085, 1985.

DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397 p.

DONGRE, A.; BHISEY, P.; KHOPKAR, U. Polarized light microscopy. **Indian Dermatol. Venereol. Leprol.**, Mumbai. v. 73, n. 3, p. 206-208, 2007.

EKFALCK, A. et al. Distribution of labeled cystine and methionine in the matrix of the stratum medium of the wall and in the laminar layer of the equine hoof. **J. Vet. Med.**, Danvers. v. 37, p. 481–491, 1990.

ELLIOTT, W. H.; ELLIOTT, D. C. The structure of proteins. In: ____ **Biochemistry and molecular biology**. Oxford: Oxford University Press, 1997. cap 2, p. 26-37.

FERNANDES, M. C. **Métodos escolhidos de técnica microscópica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1949, 615 p.

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

FREITAS, J. et al. 1966. Comunicacion sobre uma enfermidade aparecida em ganados del Uruguay em los últimos anos (Bocopa). In: CONGRESSO PANAMERICANO DE MEDICINA VETERINÁRIA Y ZOOTECNIA, 5., 1966, Caracas. **Anais...** Caracas: 1966. p. 152-159.

GINN, P. E. et al. Skin and appendages. In: MAXIE, M. G.(Ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. cap. 5, v.1. p. 553-781.

GUMMER, C. L.; DAWBER, R. P. R.; PRICE, V. H. Trichothiodystrophy: an electron-histochemical study of the hair shaft. **Br. J. Dermatol.**, Nottingham. v. 110, p. 439-449, 1984.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. The integumentary system (The skin and its appedanges). In: ____ **Histology**. 8th. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1979, cap. 20, p. 614-644.

ITIN, P. H.; SARASIN, A.; PITTELKOW, M. R. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Charleston. v. 44, p. 891-920, 2001.

ITIN, P.; FISTAROL, S. K. Hair shaft abnormalities – clues to diagnosis and treatment. **Dermatol.**, v. 211, p. 63-71, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, L.C. (Org.) **Histologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 18, p. 303-314.

KHUMALO, N. P.; DAWBER, R. P. R.; FERGUSON, D. J. P. Apparent fragility of African hair is unrelated to the cystine-rich protein distribution: a cytochemical electron microscopic study. **Exp. Dermatol.**, v. 14, p. 311–314, 2005.

KOMMERS, G. D. **Intoxicação experimental por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae) em bovinos: estudo da patogenia das lesões dos cascos, cauda, chifres e língua.** 1993. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

LEHNINGHER, A. L. **Bioquímica.** São Paulo: Edgar Blücher, 1978, v. 1, 262 p.

LEVER, W. F.; SCHAUMBURG-LEVER, G. Histologia da pele. In: ____ **Histopatologia da pele.** 7. ed. v. 1. São Paulo: Manole, 1991. cap. 3, p. 8-34.

LIANG, C. et al. Structural and molecular hair abnormalities in Trichothiodystrophy. **J. Invest. Dermatol.**, Dallas, v. 126, p. 2210–2216, 2006.

LILLIE, R. D.; BANGLE, R. The peracetic acid Schiff reaction of hair cortex. **J. Histochem. Cytochem.**, Washington, v. 2, n. 4, p. 300-310, 1954.

MANABE, M. et al., Architectural organization of filiform papillae in normal and black hairy tongue epithelium. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 135, p. 177-180, 1999.

MARLIANI, A.; GIGLI, P.; SALIN, M. Trichological microscopy in polarized light. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Nice. v. 9, (Supl. 1), p. 126, 1997.

MARSHALL, R. C.; ORWIN, D.F.G.; GILLESPIE, J.M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. **Electron Microsc. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 47-83, 1991.

MARUYAMA, T. et al. Pathogenesis in pili torti: morphological study. **J. Dermatol. Sci.**, Nagoya. (Supl. 7), p. 5-12, 1994.

MASAAKI, I. et al. Pathogenesis in Trichorrhaxis invaginata (bamboo hair). **J. Invest. Dermatol.**, Chapel Hill. v. 83, n. 4, p. 1-6, 1984.

MATOLTSY, A. G. Keratinization. **J. Invest. Dermatol.**, Chapel Hill. v. 67, n. 1, p. 20-25, 1976.

MEYER, W. et al. Comparative distribution of sulphur, thiol and disulphides in the porcine stratum corneum. **Eur. J. Dermatol.**, Paris. v. 15, n. 4, p. 243-250, 2005.

MORGAN, P. R. Neoplasms and precancerous conditions of the oral mucosa. In: McGEE, J. O.; ISAACSON, P. G.; WRIGHT, N. A (Orgs) **Oxford textbook of pathology**. 2nd. v. 2a. Oxford: Oxford University Press, 1992. cap. 14, p. 1059-1067.

MÜLLING, C. K. W. et al. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. **Anat. Histol. Embryol.**, Munich, v. 28, p. 103-108, 1999.

NAUDÉ, T. W.; BERRY, W. L. Suspected poisoning of puppies by the mushroom Amanita pantherina. **Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.**, Johannesburg. v. 68, p. 154-158, 1997

NÉSPOLI, P. B. et al. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental por selenito de sódio em equinos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro. v. 21, n. 3, p. 109-116, 2001.

NODA, T. et al. Exogenous cysteine and cystine promote cell proliferation in CaCo-2 cells. **Cell. Prolif.**, London. v. 35, p. 117-129, 2002.

NORLÉN, L.; AL-AMOUDIZ, A. Stratum corneum keratin structure, function, and formation: the cubic rod-packing and membrane templating model. **J. Invest. Dermatol.**, Chapel Hill. v. 123, n. 4, p. 715-732, 2004.

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

PEARSE, A. G. E. The histochemical demonstration of keratin by methods involving selective oxidation. **Quart. J. Micr. Sci.**, London. v. 92, p. 393-402, 1951

PEREIRA, A. L. M. Moniletrix: relato de caso. **An. Bras. Dermatol.**, São Paulo. v. 72, n. 5, p. 455-457, 1997.

POLLITT, C. **Update on the anatomy of the inner hoof wall.** Disponível em: <<http://www.equipodiatry.com/update.pdf>> Acesso em: 6. jul. 2008

PRICE, V. H. et al. Trichothiodystrophy - Sulfur-deficient brittle hair as marker for a neuroectodermal symptom complex. **Arch. Dermatol.**, Chicago. v. 116, p. 1375-1384, 1980.

PROPHET, E. B. et al. **Laboratory methods in histotechnology.** Washington: American registry of pathology, 1992. 278 p.

RIET-CORREA, F.; MENDÉZ, M. D. C. Intoxicação por Plantas e Micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Org). **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos.** 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007, v. 2, p. 99-221.

ROZZA, D. B. et al. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens* em búfalos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro. v. 24 (Supl.), p. 56-57, 2004.

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

SALLIS, E. S. V.; et al. Experimental intoxication by the mushroom *Ramaria flavo-brunnescens* in sheep. **Vet. Human. Toxicol.**, Estados Unidos, v.42, n. 6, p. 321-324, 2000.

SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; RIET-CORREA, F. Intoxicação experimental em ovinos com *Ramaria flavo-brunnescens* congelada ou dessecada. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p.107-110, 2004.

SANTOS, M. N.; BARROS, S. S; BARROS, C. S. L. Intoxicação em bovinos pelo cogumelo *Ramaria flavo-brunnescens*. **Pesq. Agropec. Bras. Sér. Vet.**, Rio de Janeiro, v.10, p.105-109, 1975.

SANTOS, M. N. et al. Intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens*. In: RIET-CORREA, F. et al. **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos.** Pelotas: Editorial Agropecuário Hemisfério Sul do Brasil, 1993. p. 309-318.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. JR.; GRIFFIN, C. G. **Dermatologia de pequenos animais.** 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1129 p. 671-686.

SCHONS, S. V. et al. Estudo histológico, imuno-histoquímico e ultra-estrutural das lesões induzidas experimentalmente por *Ramaria flavo-brunnescens* (Clavariaceae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v, 27, n. 7, p. 269-276, 2007.

SCHONS, S. V. Intoxicação experimental por *Ramaria flavo-brunnescens* em bovinos: estudo da patogenia. 2006. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SPERLING, L. C.; DiGIOVANNA, J. J. “Curly” wood and tiger tails - An explanation for light and dark banding with polarization in Trichothiodystrophy. **Arch Dermatol.**, London. v. 139, p. 1189-1192, 2003.

STEFLIK, D. E., et al. Correlated TEM, SEM, and Histological observations of filiform papillae of the cow tongue. **Acta. Anat.**, London. v. 117, p. 21-30, 1983.

STUMP, J. E. 1967. Anatomy of the normal equine foot, including microscopic features of the laminar region. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Tampa, v. 151, n. x, p. 1588-1598, 1967.

SWIFT, J. A. The electron histochemistry of cystine-containing proteins in thin transverse sections of human hair. **J. Royal Microsc. Soc.**, Oxford, v. 88, p. 449-469, 1967.

TOKARNIA, C. H., et al, **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. p. 206-209.

TOMLINSON, D. J.; MÜLLING, C. H.; FAKLER, T. M. Formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 87, n. 4, p. 797–809, 2004.

TRAUB-DARGATZ, J. L. et al. Selenium toxicity in horses. **Compend. Cont. Ed.**, Yardley, v. 8, n. 10, p. 771-776, 1986.

VALENTE, N. Y. S. et al. Polarized light microscopy of hair shafts aids in the differential diagnosis of Chédiak-higashi and Griscelli-prunieras syndromes. **Clinics.**, São Paulo, v. 61, n. 4, p. 327-332, 2006.

VAN SCOTT, E. J.; FLESCHE, P. Sulfhydryl groups and disulfide linkages in normal and pathological keratinization. **Arch. Dermatol. Syphil.**, London. v. 70, n. 2, p. 141-151, 1954.

WEEDON, D. **Skin pathology**. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2002, 1158 p.

WHITING, D. A.; DY, L. C. Office diagnosis of hair shaft defects. **Sem. Cutan. Med. Surg.**, v. 25, p. 24-34, 2006.

WOLMAN, M. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. **J. Histochem. Cytochem.**, Salt Lake City. 23, n. 1, p. 21-50, 1975.

YAGER, J. A.; WILCOCK, B.P. **Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat. Dermatopathology and skin tumors.** London: Wolfe, 1994. 320 p. v.1.

Apêndice A – Oxidação seletiva da ceratina (OSC) solução oxidante de ácido peracético (LILLIE & BANGLE, 1954).

- 1) À 259 ml de peróxido de hidrogênio a 30% adicionar 95,6 ml de ácido acético glacial
- 2) Adicionar, à mistura, 2,2 ml de ácido sulfúrico concentrado
- 3) Deixar a solução na geladeira por 24 h.
- 4) Após, acrescentar 40 mg de fosfato dissódico (Na_2HPO_4)
- 5) A solução deve ser mantida sob refrigeração e permanece estável por algumas semanas.

Apêndice B – Técnica de Swift para demonstração de cistina em seções transversais de pelo (SWIFT, 1967)

- 1) Desengordurar os pelos em éter etílico por 24 horas.
- 2) Desidratar em etanol e embeber em resina Epoxi.
- 3) Seções transversais de, aproximadamente 50-100 nm de espessura devem ser colhidas em grade de ouro.
- 4) Colocar as grades em placa de Petri, cobrir com o reagente (APÊNDICE C), e colocar sob luz, em estufa a 45°C.
- 5) Após 30 minutos lavar as grades em água destilada.
- 6) Observar em microscópio eletrônico de transmissão.

Apêndice C - Reagente metenamina-nitrato de prata

- 1) Solução A: 5 ml de nitrato de prata a 5% adicionados a 100 ml de hexametenotetramina (metenamina) a 3%.
- 2) Solução B: 10 ml de ácido bórico a 1,44% adicionados a 100 ml de bórax a 1,9%.
- 3) Solução de trabalho: 25 ml de solução A
5 ml da solução B
25 ml de água destilada

O reagente completo tem um pH de 9,2 e pode ser estocado por uma semana, em refrigerador a 0°C.