

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

TESE

A intoxicação de bovinos por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em Santa Catarina e a identificação das bactérias envolvidas nos infartos do quadro agudo

Fernanda Jönck

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

A INTOXICAÇÃO DE BOVINOS POR *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* EM SANTA CATARINA E A IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NOS INFARTOS DO QUADRO AGUDO

FERNANDA JÖNCK

Sob a Orientação do Professor
Carlos Maria Antonio Hubinger Tokarnia

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal

Seropédica, RJ
Dezembro de 2014

636.2089

J76i

T

Jönck, Fernanda, 1985-

A intoxicação de bovinos por *Pteridium* (aquilinum) arachnoideum em Santa Catarina e a identificação das bactérias envolvidas nos infartos do quadro agudo / Fernanda Jönck. - 2015.

86 f.: il.

Orientador: Carlos Maria Antonio Hubinger Tokarnia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas.

Bibliografia: f. 63-71.

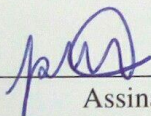
1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Bovino - Toxicologia - Santa Catarina - Teses. 3. Plantas venenosas para o gado - Santa Catarina - Teses. 4. Doenças hemorrágicas - Teses. 5. *Pteridium aquilinum* - Teses. I. Tokarnia, Carlos Maria Antonio Hubinger, 1929- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências clínicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FERNANDA JÖNCK

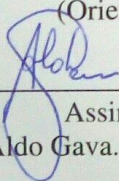
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 16/12/2014



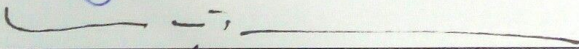
Assinatura

Carlos Antonio Maria Hubinger Tokarnia. LD. UFRRJ
(Orientador)



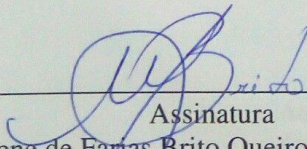
Assinatura

Aldo Gava. Dr. UDESC



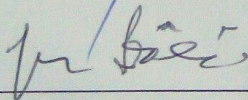
Assinatura

Iveraldo dos Santos Dutra. LD. UNESP



Assinatura

Marilene de Farias Brito Queiroz. PhD. UFRRJ



Assinatura

Jürgen Döbereiner. Dr h c. Embrapa

Dedico,

*Aos meus pais, Cristina e Jaime, e meu irmão
Leandro pela presença, apoio e amor
constantemente.*

*À minha tia Vera, meu maior exemplo de
bondade, carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre mais importante que pedir, e ao findar mais uma etapa há muitas pessoas a agradecer. Quero agradecer a Deus pela vida, pela força e pelas pessoas que cruzaram meu caminho.

À minha família, sem ela com certeza não teria ido a lugar nenhum, sem o seu apoio eu não seria o que sou hoje, não teria o que tenho hoje e não teria alcançado boa parte dos meus sonhos. Agradeço a minha mãe e meu pai, meus maiores exemplos de dignidade, de esperança e amor, sem o apoio de vocês em TODAS as horas, sem seu carinho e seu discernimento não teria chegado tão longe. À minha tia Vera, pelo apoio de sempre, pelo carinho, incentivo e ajuda a qualquer hora. Aos meus avós, Edith e Ahilton, que nunca deixaram de acreditar e sempre me esperaram de braços abertos.

Ao longo do doutorado, estive em três estados, no Rio de Janeiro, em Santa Catarina e em São Paulo. E em cada um deles tive a oportunidade de conhecer e conviver com pessoas as quais me auxiliaram no crescimento profissional, e principalmente no crescimento pessoal.

Ao professor Carlos Tokarnia, meu orientador, pessoa que terei eterna gratidão e admiração. Exemplo de profissionalismo, humildade, caráter e amor pelo que faz. Vê-lo trabalhar e atuar foram e serão fontes de inspiração, e dedicação para veterinários que trabalham com plantas tóxicas em diferentes regiões do Brasil e conviver com o senhor foi um privilégio, pelo qual agradeço e guardarei com muito carinho e amor.

Ao professor Aldo Gava, hoje posso dizer que muito mais que um professor, mas um amigo de verdade. Obrigada por todos esses anos de confiança depositada, pelo apoio e ajuda em todas as horas. Pelos ensinamentos de Patologia, Plantas Tóxicas e principalmente de vida. Minha eterna e mais sincera admiração por perceber nas pessoas uma sementinha que pode crescer, pelo seu coração gigante, pelos exemplos de trabalho, perseverança, discernimento e humildade.

Aos colegas e professores da UFRRJ, pelos ensinamentos e momentos de convivência. À professora Marilene, pelo exemplo de dedicação e carinho com todos, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos. À Juliana Prado e ao Saulo Andrade Caldas, por me receberem tão bem em Seropédica e terem me proporcionado momentos especiais. Obrigada pela amizade, companheirismo e muitas risadas ao longo do dia e a noite.

Ao Laboratório de Patologia Animal CAV-UDESC, no qual passei longos anos, onde conheci muitas pessoas, cada uma com seu jeito e tipo de conviver, onde tive ensinamentos profissionais e pessoais, onde pude ter exemplos de profissionalismo e ética, amizade, bom caráter e companheirismo. Obrigada aos professores, mestrandos, bolsistas, funcionários e estagiários pelos bons momentos e ajuda quando necessária. Obrigada Anildo, Dona Iane, Sandra, Camila, Claudinha, Claudia Wisser e Claudia Biff, Cecília, Tiffany, Leíse, Deise, Nathalia, Thaisa, Vanessa, Carla, , Leonardo, Pamela e Professora Sandra. Em especial as meninas Daiane, Elaine, Francielli e Ana Paula, pelo carinho e ajuda tão necessária na coleta de 1045 kg de samambaia, e com o cuidado com os animais. Se o trabalho saiu, com certeza foi com ajuda, tempo e dedicação de todas vocês.

Ao Djonatan, pelo companheirismo, apoio e carinho. Pelos puxões de orelha e pelas risadas em momentos em que estava “de mal com o mundo”. Pelas férias de verão em Lages colhendo samambaia e cuidando de bovinos. Mas principalmente pelo amor a mim dedicado ao longo desse tempo.

Ao professor Iveraldo, o qual me recebeu com carinho e afeição, que não mediu esforços para o auxílio nas minhas análises. Por seu profissionalismo e dedicação. Por me proporcionar conhecer a Carol, pessoa que em pouco tempo criei uma afinidade enorme, a qual me recebeu e me ajudou de forma tão carinhosa, amizade com certeza duradoura.

À Thalita, minha vizinha de casa e de mesa, obrigada pelas conversas, pela sinceridade, pelo apoio e companheirismo. Pelas risadas e bom humor.

Às amigas da república Black Tie e da academia: Emanuela, Luana, Elisandra, Rosiane, Patricia, Cilene, Dona Donzília, tia Mida, Luciana, Tamiris, Helen, Nicole, Tamy, Luzia, Mere, Flávia pelas horas de descontração, risadas, apoio e carinho.

Às amigas e amigo do “trecho Lages-Curitibanos” Mariane, Pollyni e Ademir por ouvir as inúmeras lamentações no período pré-defesa, pelo apoio e amizade.

Aos motoristas do CAV-UDESC: Ademar, Ademir, Gelson, Júlio e Maurício pela pronta ajuda e disposição.

À CAPES pela concessão da bolsa de demanda social.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta tiveram participação.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

JÖNCK, Fernanda. **A intoxicação de bovinos por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em Santa Catarina e a identificação das bactérias envolvidas nos infartos do quadro agudo**, 2014. 105f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Pteridium (aquilinum) arachnoideum é planta cosmopolita, responsável por perdas vultuosas na criação de bovinos em quase todas as regiões do Brasil. Esta planta é responsável por causar três quadros clínicos: um quadro agudo, caracterizado por hemorragias e febre, e dois quadros crônicos caracterizados por tumores de bexiga e do trato digestório superior. Em Santa Catarina, em estudo retrospectivo, a intoxicação aguda é a forma que prevaleceu sobre as demais. A maioria dos casos ocorreu no outono e os principais sinais clínicos observados foram febre e fezes com sangue. As lesões macroscópicas encontradas foram hemorragias generalizadas e infartos principalmente em pulmão, fígado, intestino e linfonodo, os quais se caracterizavam por necrose associada a agregados bacterianos basófilos, em alguns casos com formação de bolhas de gás. Na medula óssea havia rarefação ou ausência do tecido hematopoético. A reprodução experimental da doença foi realizada em quatro bovinos, dois vacinados contra clostridioses e dois não vacinados. Estes receberam doses de 20, 20, 14 e 10g/kg/dia de *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*, e morreram com 82, 94, 46 dias e 76 dias, quando tinham ingerido 149, 180, 71 e 75% de planta em relação ao peso vivo. A evolução dos sinais clínicos foi de 5, 4, 1 e 5 dias, e, à necropsia, as lesões consistiram de hemorragias em variados graus e localizações. Infartos de fígado foram encontrados nos Bovinos 2, 3 e 4 e no intestino em todos os bovinos. As lesões histológicas se caracterizaram por rarefação e ausência de tecido hematopoético na medula óssea, necrose e agregados bacterianos no fígado, pulmão, intestino e linfonodo. As lesões histológicas não revelaram reação inflamatória e quando presente, a intensidade era leve. Amostras de órgãos com infartos coletadas de necropsias nas intoxicações espontânea e experimental foram semeadas no meio de cultivo de Tarozzi e produziram gás. Cinco amostras causaram a morte dos camundongos após inoculação do meio. À necropsia desses camundongos verificou-se carcaças com cheiro pútrido, tecido subcutâneo avermelhado e com edema e líquido avermelhado na cavidade abdominal. Dois camundongos que foram eutanasiados apresentaram reação inflamatória no local da aplicação, caracterizada por áreas de aderência da pele com o tecido subcutâneo e abscessos; quatro exalavam cheiro pútrido na hora da realização da necropsia. A impressão da cápsula do fígado dos camundongos que morreram e que ficaram doentes, revelou bastonetes Gram-positivos. À histologia dos camundongos que morreram verificou-se na musculatura esquelética da região da coxa, edema e hemorragia entre as fibras, necrose e eosinofilia de fibras e grande quantidade de bastonetes basófilos, associado a infiltrado inflamatório mononuclear leve e hemorragia. Na pele também verificou-se, infiltrado inflamatório, com edema na derme e grande quantidade de bastonetes basófilos. Os demais camundongos foram eutanasiados e não tiveram alterações. A identificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do meio de Tarozzi do fígado dos camundongos que morreram foi detectado *Clostridium septicum*.

Palavras chaves: Diátese hemorrágica; Infartos; *Clostridium septicum*;

ABSTRACT

JÖNCK, Fernanda. **The cattle poisoning by *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* in Santa Catarina and the identification of bacteria involved in infarcts in the acute poisoning**, 2014. 105f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Pteridium (aquilinum) arachnoideum is a cosmopolitan plant, responsible for heavy losses in cattle for heavy losses in almost all Brazil. This plant causes three clinical pictures: an acute disease, characterized by hemorrhages and fever, and two chronic diseases characterized by bladder tumors and carcinomas of the superior digestive tract. In Santa Catarina, in a retrospective study, the acute poisoning is the form that prevailed. Most of the cases occurred in the autumn and the main clinical signs observed were fever and faeces with blood. The macroscopic lesions were widespread hemorrhages and infarcts mainly in lung, liver, intestine and lymphnodes, which were characterized by necrosis associated with groups of basophilic bacteria, sometimes with formation of bubbles of gas. In the bone marrow there was rarefaction or absence of hematopoietic tissue. The experimental reproduction of the disease was realized in four cattle, two vaccinated against clostridiosis and two not vaccinated. These cattle received doses of 20, 20, 14 and 10g/kg/day, and they died after 82, 94, 46 and 76 days, when they had ingested 149, 180, 71 and 75% of the plant in relation to their weight. The course of the clinical signs was 5, 4, 1 and 5 days, and at post-mortem examination the lesions found were hemorrhages of varied degrees and locations. Liver infarcts were found in bovines 2, 3 and 4, and in the intestine in all the cattle. The histological lesions were characterized by rarefaction and absence of hematopoietic tissue in the bone marrow, necrosis and bacterial aggregates in the liver, lung, intestine and lymphnodes. Histopathology did not reveal inflammatory reaction and if present the intensity was slight. Samples of organs with infarcts collected at necropsy, in the spontaneous and experimental intoxication, sown in Tarozzi medium, produced gas. Five samples caused death in mice after inoculation of the medium. At necropsy the carcasses had putrid smell, the subcutaneous tissue was red and there was edema and red liquid in the abdominal cavity. Two mice that were sacrificed presented inflammatory reaction in the place of the application, characterized by areas of adherence of the skin to the subcutaneous tissue and presence of abscesso, and four presented putrid smell at necropsy. The impression of the liver capsula of the mice that died or got sick, revealed small Gram positive rods. Histopathology of the mice that died, revealed in the skeletal musculature of the thighs edema between the fibers with necrosis and eosinofilia of fibers and great amount of small basophilic rods, associated with slight inflammatory mononuclear infiltration and hemorrhage. In the skin also inflammatory filtrate was observed, with edema in the derma and great amount of small basophilic rods. The rest of the mice were sacrificed and no alterations were found. The identification by Chain reaction of Polimerase (PCR) of the liver of the mice that had died, in Tarozzi medium, resulted in *Clostridium septicum*.

Index Terms: Hemorrhagic diathesis ; infarcts; *Clostridium septicum*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Espécies de <i>Clostridium</i> spp com importância veterinária.....	15
Tabela 2.	Delineamento experimental da intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em bovinos.....	18
Tabela 3.	Número total de casos de bovinos registrados no Laboratório de Patologia Animal do CAV/UEDESC, total de casos de intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> , totais de intoxicação aguda, de carcinomas do trato digestório superior e de hematuria enzoótica no período entre 1988 a 2010.....	23
Tabela 4.	Principais lesões histológicas encontradas em bovinos com intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	29
Tabela 5.	Reprodução experimental da intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em bovinos.....	40
Tabela 6.	Exame hematológico de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	43
Tabela 7.	Lesões histológicas de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	47
Tabela 8.	Isolamento bacteriano e inoculação em camundongos realizados no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais da Universidade Estadual Paulista, Curso de Medicina Veterinária, UNESP - Campus de Araçatuba, São Paulo.....	52
Tabela 9.	Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase realizados no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) – UFSM, de fígado de camundongo inoculado, meio de Tarozzi utilizado para o crescimento bacteriano, através do cultivo de amostras de áreas de infarto e do raspado do crescimento total de colônias bacterianas no ágar sangue.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição de <i>Pteridium aquilinum</i>	3
Figura 2.	<i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> . Localidade de Três Árvores, Lages, SC.....	18
Figura 3.	Cultivo e inoculação em camundongo de bactérias envolvidas nos infartos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	21
Figura 4.	Distribuição das formas de intoxicações por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em bovinos no Estado de Santa Catarina entre os anos de 1988-2010.....	22
Figura 5.	Distribuição das formas de intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> por ano.....	24
Figura 6.	Distribuição dos casos de intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> por estações do ano.....	24
Figura 7.	Órgãos de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	26
Figura 8.	Intestino delgado de bovinos na intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> . Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados.....	27
Figura 9.	Infartos de fígado, rumen e abomaso de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium arachnoideum</i> . Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados.....	28
Figura 10.	Lesões histológicas em órgãos de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> . Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados.....	30
Figura 11.	Sinais clínicos do caso de intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> acompanhado.....	32
Figura 12.	Lesões macroscópicas observadas à necropsia do bovino acompanhado clinicamente na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> ...	34
Figura 13.	Lesões histológicas de linfonodo mesentérico do bovino acompanhado clinicamente na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> ...	35

Figura 14. Brotação de <i>Pteridium arachnoideum</i> consumida e Piquete com grande infestação de <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> , Coxilha Rica, Lages, SC....	36
Figura 15. Lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	37
Figura 16. Lesões histológicas de fígado de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em necropsias realizadas entre 2011 a 2014.....	38
Figura 17. Lesões histológicas de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em necropsias realizadas entre 2011-2014.....	39
Figura 18. Aspectos das fezes dos bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	41
Figura 19. Hemorragias observadas em bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	42
Figura 20. Lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	
Figura 21. Lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	58
Figura 22. Lesões histológicas de fígado de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium arachnoideum</i>	59
Figura 23. Lesões histológicas de pulmão e medula óssea de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium arachnoideum</i>	63
Figura 24. Lesões histológicas de musculatura esquelética, rúmen e intestino de bovinos na intoxicação aguda experimental por <i>Pteridium arachnoideum</i>	63
Figura 25. Meio de cultivo de Tarozzi, necropsia de camundongo, cultivo em ágar sangue e impressão da cápsula de fígado de camundongo com inoculação de meio de Tarozzi cultivado com amostras de infartos colhidos de órgãos de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	64
Figura 26. Lesões histológicas e impressão de fígado de camundongo com inoculação de meio de Tarozzi cultivado com amostras de infartos colhidos de órgãos de bovinos na intoxicação aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	56
Figura 27. Eletroforese em gel de agarose. Reação em cadeia da Polimerase. Marcações positivas para <i>Clostridium septicum</i>	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>.....	2
2.1.1 Aspectos botânicos.....	2
2.1.2 Princípio tóxico.....	3
2.2 Intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>.....	5
2.2.1 Intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em bovinos.....	5
2.2.1.1 Diátese hemorrágica.....	6
2.2.1.2 Hematúria enzoótica.....	9
2.2.1.3 Carcinomas de vias digestórias superiores.....	10
2.2.2 Associação do Papilomavirus bovino (BPV-2) em lesões tumorais de hematúria enzoótica e carcinomas de trato digestório superior.....	11
2.2.3 Intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em monogástricos.....	11
2.2.4 Intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em ovinos.....	13
2.2.5 Intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> em humanos.....	13
2.3 Gênero <i>Clostridium</i>.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Estudo Retrospectivo.....	16
3.2 Surtos Acompanhados de Casos de Intoxicação Aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>.....	16
3.2.1 Coleta de históricos.....	16
3.2.2 Acompanhamento de caso clínico.....	16
3.2.3 Realização de necropsias.....	16
3.2.4 Histologia.....	17

3.3 Reprodução Experimental.....	17
3.3.1 Coleta e administração de brotos de samambaia.....	17
3.3.2 Animais utilizados.....	17
3.3.3 Manejo dos animais.....	19
3.4 Exame Microbiológico e Isolamento Bacteriano.....	20
3.4.1 Isolamento bacteriano.....	20
3.4.2 Inoculação em camundongo.....	20
3.4.3 Cultivo em ágar sangue.....	21
3.4.4 Identificação da espécie envolvida por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Estudo Retrospectivo.....	22
4.2 Caso Clínico e Realização de Necropsias de Casos de Intoxicação Aguda por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i> Durante o Período de Janeiro de 2011 a Junho de 2014.....	31
4.2.1 Caso clínico.....	31
4.2.2 Necropsias realizadas.....	35
4.3 Reprodução Experimental.....	40
4.4 Isolamento e Identificação bacteriana.....	52
4.4.1 Isolamento bacteriano.....	52
4.4.2 Identificação da espécie bacteriana envolvida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A intoxicação por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* (Samambaia) é uma das intoxicações por plantas mais importantes no Brasil, seja por sua ampla distribuição ou pela perda econômica causada em criações de bovinos. Ainda hoje, é uma planta que, fora do meio acadêmico, poucos sabem ou aceitam que seja tóxica.

Pteridium (aquilinum) arachnoideum é encontrada em quase todo território nacional, e na região sul do Brasil, particularmente em Santa Catarina, é uma das principais causas de morte em bovinos.

Essa planta é responsável por causar três tipos distintos de manifestações clínicas em bovinos, conforme a quantidade de planta ingerida. Uma forma, de caráter agudo, é caracterizada por febre alta, hemorragias e anemia profunda, e é conhecida como síndrome hemorrágica ou diátese hemorrágica. *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* causa ainda dois quadros crônicos caracterizados por formações de neoplasias, os carcinomas escamosos no trato digestório superior e os tumores na bexiga, esses últimos responsáveis pela hematuria enzoótica.

Os animais acometidos pela diátese hemorrágica apresentam anemia e fezes com sangue, petéquias nas mucosas e morte rápida. À necropsia observam-se lesões como hemorragias, broncopneumonia fibrinosa e infartos, no fígado, pulmão, e intestino.

Ao exame histológico, além das lesões de rarefação e desaparecimento do tecido hematopoético e das hemorragias, são vistas outras lesões como enterite fibrinonecrótica e infartos localizados em diferentes órgãos como fígado, pulmão e intestino, associadas a agregados de bactérias, usualmente com pouca ou nenhuma reação inflamatória.

As alterações clínicas, lesões macroscópicas e microscópicas observadas na intoxicação aguda por samambaia são muito variáveis, de surto para surto e de animal para animal. Essa variedade de sinais clínicos e lesões macroscópicas podem induzir a erro de diagnóstico. A caracterização clínica da intoxicação aguda por *P. arachnoideum*, com variação de sinais e lesões macroscópicas e microscópicas, bem como a identificação de outros agentes infecciosos associados, é fundamental para compreensão e confirmação do diagnóstico. Identificar o tipo de bactéria envolvida nesses infartos é importante para esclarecer a patogenia do quadro clínico patológico.

Os objetivos deste trabalho foram descrever a epidemiologia, o perfil da intoxicação por *P. arachnoideum* no Estado de Santa Catarina, principalmente a forma aguda, através do estudo retrospectivo e da descrição de surtos da doença; reproduzir experimentalmente a doença; isolar e identificar os bastonetes encontrados nos infartos do quadro agudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*

2.1.1 Aspectos botânicos

O gênero *Pteridium* pertence à família Dennstaedtiaceae. Até pouco tempo conhecia-se somente uma espécie, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, a qual possuía duas subespécies, uma *P. aquilinum* ssp. *aquilinum*, com oito variedades, *P. aquilinum* var. *aquilinum*, var. *revolutum*, var. *pubescens*, var. *feei*, var. *decompositum*, var. *pseudocaudatum*, var. *laticulum* e var. *africanum*, e a outra subespécie *P. aquilinum* ssp. *caudatum*, com quatro variedades, *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum*, var. *arachnoideum*, var. *esculentum* e var. *variabense* (TRYON, 1941). Recentemente, a espécie foi reclassificada conforme caracteres genéticos e morfométricos, e tem sido proposto que essas variedades são espécies distintas. A espécie predominante no Brasil recebeu a denominação de *Pteridium arachnoideum*, juntamente com o antigo epíteto da espécie *aquilinum* entre parênteses (THONSON, MICKEL e MEHLTRETER, 2008; GIL da COSTA et al., 2012).

Pteridium aquilinum é conhecida como samambaia, samambaia-comum, samambaia das taperas, feito, feto, pluma-grande e samambaia-açu. É uma planta perene, rizomatosa, herbácea, ereta, muito ramificada, glabra, mede de 50-160 cm em altura, e sua propagação ocorre por esporos e por rizomas. A reprodução ocorre de forma assexuada, e estes órgãos se localizam na face inferior dos folíolos (LORENZI, 1982).

Pteridium aquilinum cresce em solos com uma extensa faixa de pH, entre 2,8 a 8,6, mas tem predileção por solos ácidos, arenosos e de baixa fertilidade (TOKARNIA et al., 2012). Desenvolve-se melhor em regiões frias e de boa pluviosidade (TOKARNIA, DÖBEREINER e SILVA, 1979). Os rizomas, estruturas armazenadoras de carboidratos, podem ter 2,0 a 2,5 cm de diâmetro, e podem atingir até 50 cm de profundidade, isso faz com que resistam a queimadas. Infesta pastagens, solos cultivados, beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI, 1982). Possui alta capacidade de invasão, por se propagar de forma vegetativa, por seus rizomas e de forma assexuada, através dos esporos (MATOS et al., 2011). Por essa sua capacidade invasiva pode se tornar difícil o controle nas áreas invadidas.

Pteridium aquilinum apresenta distribuição cosmopolita, e está presente em todos os continentes (TOKARNIA et al., 2012) exceto Antártida (FENWICH, 1988). O Chile é o único país da América do Sul em que não há samambaia, devido provavelmente, à barreira formada pela vasta cadeia dos Andes, os desertos do norte e a prevalência dos ventos do Pacífico que bloqueiam a dispersão de esporos provenientes de países vizinhos como Argentina e Bolívia (ALONSO-AMELOT et al., 2001). No Brasil, é encontrada em quase todo o território, principalmente em regiões montanhosas, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Figura 1) (TOKARNIA et al., 2012).

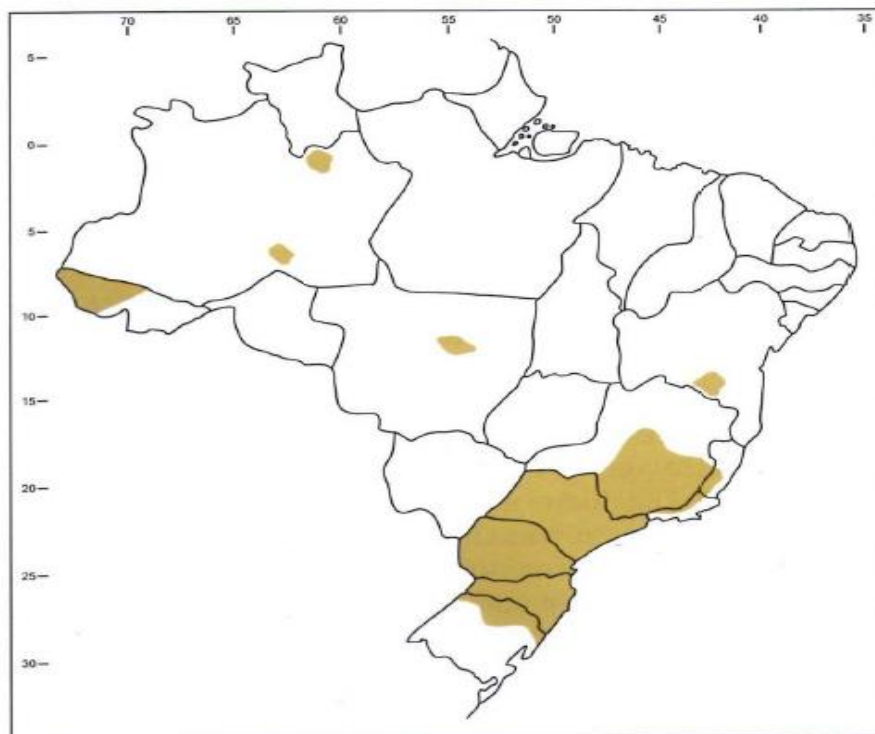


Figura 1. Distribuição de *Pteridium aquilinum*. Fonte: TOKARNIA et al., 2012.

2.1.2 Princípio tóxico

Pteridium aquilinum possui uma grande variedade de compostos que foram isolados na tentativa de identificar quais eram as substâncias responsáveis pelas formas de intoxicação aguda e crônica. Algumas espécies, *P. aquilinum* var. *arachnoideum*, da Venezuela e *P. aquilinum*, do norte de Portugal, contêm glicosídeos cianogênicos (GIL da COSTA et al., 2012). Substâncias como ácido chiquimico (EVANS e OSMAN, 1974), quercitina (PAMUKCU et al., 1980a) e taninos (WANG et al., 1976a,b) foram isolados e apontados por causarem efeitos carcinogênicos, porém quando essas substâncias foram administradas em ratos ou camundongos não produziram tumores (HIRONO, FUSHIMI e MATSUBARA, 1977; PAMUKCU et al., 1980b; HIRONO et al., 1981; MORINO et al., 1982).

Os princípios tóxicos responsáveis pelas formas clínicas produzidas pela intoxicação pela samambaia são o glicosídeo norsesquiterpeno ptaquilosídeo e a tiaminase (TOKARNIA et al., 2012).

A tiaminase é responsável por causar alterações patológicas em monogástricos, principalmente em equinos (EVANS, 1976; VALLI, 1992; TOKARNIA et al., 2012). Em 1958, concluiu-se que a tiaminase não seria o princípio tóxico responsável pela diátese hemorrágica, uma vez que, em experimentos com *Equisetum arvense*, planta que possui tiaminase comparável à de *P. aquilinum* e com bactérias que produzem tiaminase como *Bacillus thiaminolyticus* e *Clostridium thiaminolyticum*, não se conseguiu reproduzir a síndrome hemorrágica em bovinos. Somente o extrato alcoólico de *P. aquilinum* foi capaz de reproduzir a diátese hemorrágica (EVANS et al., 1958). A suplementação com tiamina não modifica as alterações ocorridas na diátese hemorrágica (FENWICH, 1988).

O ptaquilosídeo ou aquilídeo é intermediário da biossíntese de pterosídeos. Este composto foi isolado por Niwa et al. (1983) e Van der Hoeven et al. (1983), e o seu efeito carcinogênico foi comprovado por Hirono et al. (1984a). Pela administração do ptaquilosídeo puro, por via oral, reproduziu a diátese hemorrágica em bezerros (HIRONO et al., 1984b), o qual é responsável pela ação de depressão da medula óssea, semelhante ao efeito radiomimético (EVANS, 1984).

O ptaquilosídeo é estável em temperatura ambiente, mas é um composto instável em solução aquosa, na presença de ácidos, bases e calor, degradando-se rapidamente em pterosina B e O (FUKUOKA et al., 1978; YOSHIHARA et al., 1978) que não possuem efeito carcinogênico (YOSHIHARA et al., 1978). Em condições alcalinas, o ptaquilosídeo pode dar origem a um conjugado chamado dienona (APT) (SAITO et al., 1989). O anel ciclopropil da dienona se abre promovendo o aparecimento de uma terminação hidroxila livre que interage com um átomo de nitrogênio da base adenina do DNA (OJIKI et al., 1987). Considera-se que a dienona seja o princípio ativo (MATOBA et al., 1989); é capaz de associar-se quimicamente a uma infinidade de proteínas com terminais amino expostos, como o DNA, uma vez que ele atravessa a membrana celular e nuclear dessas células (ALONSO-AMELOT, 1999). Esse princípio causa no núcleo uma alteração permanente e irreparável em genes que codificam a ativação de outros genes ou tem função reguladora de outros processos bioquímicos, por exemplo, o gene p53 que regula a apoptose e supressão de tumores (SANTOS et al., 1992). Esta proporciona a formação e multiplicação de um tecido afuncional e canceroso (ALONSO-AMELOT, 1999). Cobaias que foram expostas à dienona demonstraram a ativação do proto-oncogene *H-ras*, que é associado à produção de diversos tipos de neoplasias (SHAHIN et al., 1998).

O efeito carcinogênico de *P. aquilinum* pode variar de acordo com a espécie animal envolvida; os bovinos desenvolvem neoplasias no trato digestório superior e na bexiga (TOKARNIA et al., 2000), ovelhas, geralmente apresentam tumores intestinais (EVANS, 1968).

A intoxicação crônica por *P. aquilinum* em bovinos leva ao desenvolvimento de neoplasias principalmente nas vias digestórias superiores, principalmente na faringe, no esôfago e na bexiga; estes órgãos possuem condições alcalinas que favorecem a transformação do ptaquilosídeo em dienona. O pH alcalino da saliva e da urina de bovinos favorece o aparecimento de tumores nesses órgãos. Em monogástricos, o pH ácido do estômago inativa parte do ptaquilosídeo, dando origem às pterosinas B e O. A maior parte do ptaquilosídeo vai ao intestino sem sofrer decomposição, este não é absorvido, devido ao seu alto peso molecular e hidrofília (MATOBA et al., 1987). As condições ácidas da bexiga dos monogástricos não propiciam a formação de tumores pelo ptaquilosídeo (VAN der HOEVEN et al., 1983).

Todas as partes da planta são tóxicas, porém a concentração do ptaquilosídeo varia consideravelmente com a idade e a parte da planta. O rizoma e o ápice do broto, de onde irão desenvolver-se as folhas, são as partes que concentram a maior quantidade dessa substância (EVANS et al., 1961; HIRONO et al., 1973; SAITO et al., 1989). O maior nível do ptaquilosídeo no broto ocorre na primavera e declina gradualmente próximo ao inverno (SMITH et al., 1999); com a maturidade da planta a toxicidade diminui (TOKARNIA et al., 2012).

Os sinais clínicos ou a forma de intoxicação em bovinos dependerá da quantidade de planta consumida e o período de tempo de ingestão. Para ocorrer a intoxicação aguda, a dose deverá ser elevada (maior que 10g/kg por dia), e para a ocorrência das formas de evolução crônica a ingestão é de semanas a poucos meses (TOKARNIA et al., 2012).

A prevalência de cada forma de intoxicação varia de região para região (TOKARNIA et al., 1969), pois a concentração do princípio tóxico pode variar dependendo das condições geográficas e ambientais (HIRONO et al., 1973; VILLALOBOS SALAZAR et al., 1999).

2.2 Intoxicação por *Pteridium aquilinum*

A intoxicação por *Pteridium aquilinum* causa diferentes tipos de intoxicação em diversas espécies de animais, conforme o efeito causado por seus princípios tóxicos (TOKARNIA et al., 2000). Em monogástricos atuará o princípio tóxico responsável por distúrbio neurológico, a tiaminase, que atua principalmente em equinos (EVANS, 1951; EVANS et al., 1963; DINIZ et al., 1984; FERNANDES et al., 1990; MARTINI-SANTOS, 2010; TOKARNIA et al., 2012). Em ruminantes, o ptaquilosídeo é o responsável pelo efeito radiomimético e pela formação de neoplasias. Os bovinos apresentam três formas da doença, diátese hemorrágica (EVANS et al., 1954a; HIRONO et al., 1984a; VALLI, 1992; TOKARNIA et al., 2012), hematúria enzoótica (PAMUCKU, 1955; DÖBEREINER et al., 1967; PRICE & PAMUCKU, 1968; TOKARNIA et al., 1969; PAMUCKU et al., 1976; RAVE et al., 1978; SOUZA e GRAÇA, 1993; OLIVEIRA, 2009; TOKARNIA et al., 2012) e carcinomas de vias digestórias superiores (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; SOUTO et al., 2006; TOKARNIA et al., 2012). Nos ovinos são descritos quadros de diátese hemorrágica (PARCKER e McCREA, 1965; SUNDERMAN, 1987), hematúria enzoótica (HARBUTT e LEAVER, 1969), tumores intestinais e degeneração progressiva da retina (“Brigth blindness”) (WATSON et al., 1965; WILCOCK, 2007).

2.2.1 Intoxicação por *Pteridium aquilinum* em bovinos

Na região sul do Brasil, a intoxicação por *P. aquilinum* é a causa de muitas mortes em bovinos. No Paraná, é uma das principais causas de mortes em bovinos; ocorre em 105 municípios de 399 existentes (POLACK, 1990). No rio Grande do Sul, das mortes causadas por plantas tóxicas, é a segunda planta mais importante; em 16 anos, ocorreram 55 casos de intoxicação por *P. arachnoideum*, dos quais 50 correspondiam à forma crônica, 46 eram caracterizados pelo desenvolvimento de carcinomas de células escamosas no trato digestório e quatro por hematúria enzoótica. Apenas cinco casos correspondiam à forma aguda (RISSI et al., 2007). Em Santa Catarina, em cinco anos, de 572 casos de mortes de bovinos causadas por plantas tóxicas, 244 correspondiam à intoxicação por *P. arachnoideum*. Destes 122 (50%) são da síndrome hemorrágica, 103 (42%) de carcinomas de células escamosas no trato digestório superior e 19 (8%) de hematúria enzoótica (GAVA et al., 2002).

Em bovinos a intoxicação por *P. aquilinum* apresenta-se de três formas: uma manifestação aguda caracterizada por hemorragias, a diátese hemorrágica, por ingestão de quantidades maiores que 10g/kg por dia durante algumas semanas a poucos meses e outras duas formas, de caráter crônico, que ocorrem por ingestão de quantidades de planta menores que 10g/kg por dia durante muitos meses a anos. Um quadro se caracteriza por formações neoplásicas na bexiga, a hematúria enzoótica. O outro quadro é representado por tumores do trato digestório superior, os carcinomas epidermóides de vias digestórias superiores (TOKARNIA et al., 2012).

2.2.1.1 Diátese hemorrágica

O primeiro relato de intoxicação aguda, caracterizada por febre alta, hemorragias e elevada letalidade foi descrito na Inglaterra, no final do século XIX, após uma severa seca, sem se fazer a associação entre o desenvolvimento da doença e a ingestão de *P. aquilinum* (PENBERTHY, 1893; STORRAR, 1893). Somente um ano após concluiu-se que a causa desse surto estaria associada à samambaia (ALMONT, 1894). Realizados alguns estudos experimentais com a planta, sem reproduzir a doença, levantou-se a hipótese de que a enfermidade era carbúnculo hemático, o que dificultou os estudos sobre sua etiologia (FENWICK, 1988).

Na década de 1950, houve relatos no estado da Geórgia, Estados Unidos, que foram relacionados a *P. aquilinum*, e que ocorreram num período em que houve restrição de pastagem (SIPPEL, 1952). Estudos detalhados e experimentais determinaram que *P. aquilinum* era responsável pela síndrome hemorrágica (EVANS et al., 1954 a,b,c; NAFTALIN e CUSHINE, 1954; EVANS et al., 1958). Posteriormente, a doença foi descrita no Reino Unido (PARKER e McCREA, 1965), na Nova Zelândia (HICKMAN, 1910 *apud* HEESCHEN, 1959) e na Austrália (SUNDERMAN, 1987).

No Brasil, o diagnóstico da intoxicação aguda foi descrita em 1967 nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais (TOKARNIA et al., 1967), no Paraná (BASILE et al., 1981; MARÇAL, 2001), em Santa Catarina (GAVA et al., 2002), no Rio Grande do Sul (BARROS et al., 1987; RISSI et al., 2006; ANJOS et al., 2008) e no Mato Grosso (FURLAN et al., 2014).

A intoxicação aguda por ingestão dos brotos em bovinos, ocorre em maior intensidade na primavera (outubro-dezembro) (GAVA, 1993; ANJOS et al., 2008), mas em regiões com temperatura elevada pode ocorrer o ano todo (TOKARNIA et al., 1967; GAVA, 1993; MARÇAL, 2001). Descreve-se que uma maior manifestação clínica de surtos agudos na época do inverno ocorre devido à escassez das pastagens e pelo fato da samambaia suportar bem a seca (MARÇAL, 2001). Outras situações que são associadas a esta forma de intoxicação são períodos com carência de material fibroso (TOKARNIA et al., 2012), superlotação em pastos pequenos, rebrota após queimada ou roçada (GAVA, 1993); alguns animais podem desenvolver um gosto especial pela ingestão da planta (vício) (EVANS, et al. 1954a; TOKARNIA et al., 1967).

A intoxicação aguda, também chamada de síndrome hemorrágica aguda ou diátese hemorrágica, ocorre em bovinos jovens e adultos (EVANS & MASON, 1965), com idade de seis meses até dois anos (TOKARNIA et al., 1967). A intoxicação aguda é caracterizada por uma síndrome hemorrágica em quase todas as vísceras; a morte dos animais ocorre em torno de 12 a 72 horas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (SIPPEL, 1952; DURÃO et al., 1995). Esta forma clínica da doença é popularmente conhecida por “suor de sangue” (MARÇAL, 1990; NIERO et al., 1991), devido a uma manifestação clínica de hematidrose (MARÇAL, 2000). O índice de morbidade da doença é baixo, em torno de 10 a 15% (SIPPEL, 1952), porém a letalidade é alta (EVANS et al., 1954a; TOKARNIA et al., 1967; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009).

O animal deve ingerir quantidades diárias maiores que 10g/kg (10-30g/kg), num período de duas a oito semanas (EVANS et al., 1954; EVANS, 1961; HOPKINS, 1986) ou até o peso da planta ingerida se igualar ao peso do animal (TOKARNIA et al., 2012). Experimentalmente, Anjos et al. (2009) reproduziram a doença, no Rio Grande do Sul, ao administrar doses diárias de 8g/kg (o total ingerido correspondeu a 59,3% do peso do animal), 8,6g/kg (63,3%), 10,2g/kg (47,4%) e 10,6g/kg (47,5%) durante 53 a 58 dias.

Os sinais clínicos têm início de três semanas após o início da ingestão, até oito semanas depois da última ingestão da planta (EVANS et al., 1954a; EVANS & EVANS, 1961; STÖBER, 1970). Os bovinos apresentam pelos arrepiados, salivação, perda de apetite, perda de peso, dispneia, fezes enegrecidas e fétidas ou diarreicas com sangue, febre (41-42°C), mucosas tornam-se pálidas, com petéquias na conjuntiva, gengiva e mucosa vulvovaginal, ulcerações nas narinas e epistaxe (SIPPEL, 1952; EVANS et al., 1954c; TOKARNIA et al., 1967; DÖBEREINER et al., 1967; BARROS et al., 1987; VALLI, 1992; ANJOS et al., 2008; FURLAN et al., 2014). Os animais permanecem longos períodos em decúbito, apresentam hemorragias frequentes no local de picadas de insetos, por agulhas e traumas (TOKARNIA et al., 1967; PAMUKÇU & PRICE, 1969). O sangue desses animais ao ser puncionado apresenta-se aquoso (BARROS et al., 1987; ANJOS et al., 2008). São relatados sangue na urina (ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009) e no leite (ANJOS et al., 2008).

A morte ocorre em dois (ANJOS et al., 2008) a três dias (TOKARNIA et al., 1967; VALLI, 1992) após o início dos sinais, excepcionalmente em uma semana (TOKARNIA et al., 1967) a oito dias (NAFTALIN e CUSHINE, 1965). Anjos et al. (2009) reproduziram o quadro clínico com evolução de 5-6 dias, e os sinais clínicos foram semelhantes aos encontrados na intoxicação natural.

O exame hematológico revela trombocitopenia, aumento no tempo de coagulação e neutropenia (SIPPEL, 1952; TOKARNIA et al., 1967; BARROS et al., 1987). Como há neutropenia acentuada, os valores relativos aos linfócitos são altos, o que dá a falsa impressão de linfocitose (HIRONO et al., 1984; TOKARNIA et al., 2012). Hayashi (1981) e Anjos et al. (2009) relataram que bovinos intoxicados revelam depressão da atividade da medula óssea com trombocitopenia e leucopenia e que a diminuição na contagem plaquetária está associada à diminuição na contagem de megacariócitos, comprovada pela biópsia de medula óssea.

Na biópsia de medula óssea de bovinos intoxicados experimentalmente, observou-se diminuição na quantidade de células hematopoéticas, mieloide e eritroide, com ausência total de megacariócitos. As únicas células vistas nos esfregaços eram precursores eritroides, como metarrubríctos e rubríctos (ANJOS et al., 2009).

De acordo com Yamane et al. (1975), há aumento da fragilidade capilar e do tempo de sangramento, com diminuição na retração do coágulo, causado pela trombocitopenia e aumento do fibrinogênio. A hemorragia acentuada, frequente nessa enfermidade, é explicada pelo aumento da fragilidade capilar, como provável consequência da trombocitopenia persistente e febre (VALLI, 1992; RADOSTITS et al., 2002).

Evans (1958) comparou os sinais clínicos da intoxicação por *P. aquilinum* aos sintomas causados pelo excesso de exposição à radiação ionizante (raios X) ou substâncias químicas radiomiméticas, os quais são semelhantes. Há alterações características de uma condição inflamatória sistêmica aguda, como as induzidas por radiação; esses distúrbios incluem modificações humorais como aumento dos níveis de heparina e histamina no sangue e nos tecidos, bem como aumento do número de mastócitos no tecido conjuntivo subcutâneo (EVANS, 1984).

A bacteremia é parte importante na patogenia da intoxicação aguda por ptaquilosídeo. A invasão bacteriana é facilitada pela neutropenia, e a bacteremia resultante poderá causar infartos no fígado, se os pequenos vasos forem obstruídos pelos trombos de bactérias. Os microorganismos podem ser levados para a circulação sistêmica, causando infartos em outros órgãos (RADOSTITS et al., 2002). As bactérias são saprófitas em muitos dos casos, e com o

passar do tempo após a morte, as lesões localizadas se expandem pelas colônias no foco de putrefação (VALLI, 1992).

As lesões macroscópicas consistem em palidez de mucosas com petéquias, principalmente nas gengivas, conjuntivas, vulva e vagina, equimoses e sufusões nas mucosas e serosas das cavidades torácica e abdominal com graus variáveis de intensidade e distribuição, especialmente omento, mesentério, pré-estômago e intestino. Há hemorragias inter e intramusculares. Ocasionalmente há sangue livre nas cavidades formando hemoperitônio e hemotórax. Há úlceras e coágulos na mucosa do abomaso, intestino delgado e cólon, com coágulos de sangue, detritos necróticos e fibrina aderidos ou não a mucosa, petéquias e sufusões em outros órgãos como bexiga, baço, vesícula biliar e coração (SIPPEL, 1952; TOKARNIA et al., 1967; BARROS et al., 1987; VALLI, 1992; TOKARNIA et al., 2000; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009; FURLAN et al., 2014), linfonodos tumefeitos, com superfície de corte úmida (ANJOS et al., 2009), fígado com áreas de contornos irregulares, firmes, pálidas na parte central rodeadas por halo de hemorragia, atingindo cápsula e parênquima (ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009). No conteúdo ruminal pode haver fragmentos da samambaia (BARROS et al., 1987). Experimentalmente, Anjos et al. (2009) ainda descrevem, na bexiga dos quatro animais intoxicados, urina com sangue e no exame dos testículos, petéquias e pequenas sufusões no mesórquio e túnica vaginal ao longo do epidídimo, assim como em todo o parênquima testicular e hemartrose acentuada nas articulações dos membros pélvicos.

No exame histológico são confirmadas as hemorragias vistas macroscopicamente e rarefação e desaparecimento do tecido hematopoético (SIPPEL, 1952; EVANS et al., 1954c; TOKARNIA et al., 1967; TOKARNIA et al., 2000; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009; FURLAN et al., 2014). Há focos de necrose com hemorragia no coração (TOKARNIA et al., 1967), enterite fibrinonecrótica e hemorrágica e edema da parede do abomaso (ANJOS et al., 2008). Na mucosa intestinal há perda de vilosidades, com grande quantidade de células sanguíneas, fibrina e agregados bacterianos (ANJOS et al., 2009). No fígado são observadas múltiplas áreas de necrose de coagulação associadas a agregados de bacilos (TOKARNIA et al., 1967; VALLI, 1992; ANJOS et al., 2008). Infartos renais e esplênicos causados por trombose séptica são achados menos frequentes (ANJOS et al., 2008). As áreas de infartos são causadas por embolias bacterianas localizadas em pequenos ramos da veia porta, sinusoides e veia central (VALLI, 1992). Usualmente, pouca ou nenhuma reação celular ocorre devido às embolias bacterianas ou nas áreas de necrose em locais de infarto (VALLI, 1992).

No diagnóstico diferencial, devem ser consideradas enfermidades com sintomatologia semelhante à pasteurelose (BARROS et al., 1987; TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000), babesiose e anaplasmoze (SIPPEL, 1952; BARROS et al., 1987), leptospirose (BARROS et al., 1987), intoxicação por *Crotalaria* spp. (SIPPEL, 1952), intoxicação por trevo doce mofado, hemoglobinúria bacilar (SIPPEL, 1952), intoxicação por warfarina e estrógenos (POLACK, 1990), carbúnculo hemático (BARROS et al., 1987), pneumonia aguda (SIPPEL, 1952) e síndrome produzida por irradiação ionizante (HAGAN, 1952; EVANS et al., 1954 a; 1954b; 1954c).

Para profilaxia, recomenda-se a retirada imediata dos animais das áreas com samambaia (MARÇAL et al., 2001; TOKARNIA et al., 1979).

2.2.1.2 Hematúria enzoótica

A hematúria enzoótica (HE) ocorre quando os bovinos ingerem quantidades menores que 10g/kg por dia durante um ou mais anos (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; PAMUCKU et al., 1976). Esta doença é conhecida pelos nomes de hematúria vesical bovina, cistite crônica, hematúria essencial e hematúria vesical crônica (RAVE et al., 1978). É caracterizada pela ocorrência de hiperplasia ou processos neoplásicos na bexiga, pois a existência de tumores na bexiga sem a associação à ingestão de *P. aquilinum* é rara (BROBST e OLSON, 1963).

Em regiões severamente invadidas por *P. aquilinum*, os prejuízos econômicos são muito significativos, em especial na bovinocultura de leite. Em algumas propriedades das regiões afetadas cerca de 90% das vacas de leite urinam sangue (FRANÇA et al., 2002).

Os animais acometidos frequentemente têm idades superiores a quatro anos. O longo período de ingestão até a manifestação dos sinais clínicos, faz com que ocorra principalmente em bovinos leiteiros ou utilizados para trabalho, por permanecerem por um período maior nas propriedades.

A melhora do animal pode ocorrer na fase inicial da doença, se os animais forem retirados do pasto invadido pela planta e receberem boa alimentação (STÖBER, 1970), entretanto, se houver nova ingestão, a hematúria recomeça com rapidez (TOKARNIA et al., 2000). Galvão et al., (2012) acompanharam um grupo de 26 bovinos, destes apenas dois alcançaram peso de abate em boas condições corporais, os demais morreram dentro de no máximo dois anos. Dessa forma pode-se afirmar que bovinos com HE não se recuperam.

Os sinais clínicos da hematúria enzoótica caracterizam-se por hematúria intermitente, anemia e emagrecimento (PAMUCKU et al., 1976; SOUZA e GRAÇA, 1993; FRANÇA et al., 2002; SOUTO et al., 2006). Incontinência urinária, micção frequente, obstruções e infecções secundárias do sistema urinário são outros achados menos frequentes (PAMUCKU et al., 1976; FRANÇA et al., 2002).

À necropsia, as lesões encontradas são especificamente na bexiga e caracterizam-se por nódulos de tamanhos variados (de milímetros a alguns centímetros), únicos ou múltiplos, formações com aspecto de couve-flor esbranquiçadas, amareladas ou avermelhadas (TOKARNIA et al., 2012), com ou sem hemorragia associada (PRICE & PAMUCKU, 1968; SOUZA E GRAÇA, 1993). Em casos mais graves há espessamento da parede (TOKARNIA et al., 2000). Na mucosa podem ser vistas ainda, congestão, focos de hemorragia e crescimentos vasculares (PAMUCKU, 1955; OLIVEIRA, 2009).

Histologicamente os tumores encontrados são hemangiomas (PAMUCKU et al., 1976; SOUZA e GRAÇA, 1993; PEIXOTO et al., 2003; SOUTO et al., 2006; GABRIEL et al., 2009; OLIVEIRA, 2009; LUCENA et al., 2011), hemangiossarcomas (SOUZA e GRAÇA, 1993; PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al. 2004; SOUTO et al., 2006; GABRIEL et al., 2009; OLIVEIRA, 2009; LUCENA et al., 2011), papilomas (SOUZA e GRAÇA, 1993; GABRIEL et al., 2009), carcinoma *in situ* (PEIXOTO et al., 2003; OLIVEIRA, 2009), fibromas (PAMUCKU et al., 1976; GABRIEL et al., 2009; LUCENA et al., 2011), carcinomas de células de transição (GABRIEL et al., 2009; LUCENA et al., 2011), leiomiiossarcomas (PAMUCKU et al., 1976; OLIVEIRA, 2009; LUCENA et al., 2011); fibrossarcomas (PAMUCKU et al., 1976), carcinomas epidermoides (PAMUCKU et al., 1976; SOUZA e GRAÇA, 1993; LUCENA et al., 2011), carcinomas indiferenciados (PAMUCKU et al., 1976), adenocarcinomas, carcinomas uroteliais e adenocarcinomas mesonfróides (OLIVEIRA, 2009). Os diferentes tipos de

neoplasias, de origem epitelial e mesenquimal, podem ocorrer separadamente ou em uma bexiga de um mesmo animal, concomitantes (OLIVEIRA, 2009; TOKARNIA et al., 2012).

Lesões inflamatórias e alterações não neoplásicas são observadas também, como hiperplasia, ninhos de Brunn, cistite cística (CARVALHO et al., 2006; GABRIEL et al., 2009), metaplasia glandular (cistite glandular e metaplasia intestinal) (CARVALHO et al., 2006) e ainda cistite supurativa crônica, com presença de linfócitos agrupados em grandes quantidades na forma de folículos, infiltrado plasmocitário e macrofágico, edema, fibrose, descamação do urotélio e ulceração hemorrágica (GONZÁLES et al. 2004; GABRIEL et al., 2009).

Metástases são raras e são descritas metástases de hemangiossarcoma em baço e em linfonodo (GONZÁLES et al., 2004), em linfonodos ilíacos (PAMUCKU et al., 1976) e em pulmão (PAMUCKU et al., 1976).

A HE, está frequentemente associada a carcinomas das vias digestórias superiores (DÖBEREINER et al., 1967; SOUZA e GRAÇA, 1993; OLIVEIRA, 2009) e papilomas (SOUZA e GRAÇA, 1993; GALVÃO et al., 2012).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com doenças que atingem o sistema urinário como urolitíases e pielonefrites, e com hemoglobinúria, causada por hemoparasitos (SOUZA e GRAÇA, 1993).

2.2.1.3 Carcinomas de vias digestórias superiores

Em regiões onde os pastos são altamente invadidos por *P. aquilinum*, há elevada incidência de carcinomas escamosos, uma vez que, sem a presença dessa planta, esses mesmos tumores são raros (TOKARNIA et al., 2012). Esses tumores se caracterizam por carcinomas epidermoides queratinizantes (DÖBEREINER et al., 1967). São conhecidos em diferentes regiões do Brasil por “figueira na “goela”, “cravo”, “favo”, “garrotinho” ou “caraguatá” (DÖBEREINER et al., 1967).

Os animais acometidos têm idade avançada, com cinco anos ou mais, e a quantidade de *P. aquilinum* ingerida por dia é menor do que aquela que causa hematúria enzoótica, por um período mais prolongado (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969).

A evolução pode levar meses a anos e os tumores atuam por causar perturbações de ordem mecânica na ingestão e regurgitação dos alimentos (TOKARNIA et al., 2012). Os sinais clínicos dependem da localização dos tumores. Se estes se localizarem na base de língua, os sinais de ronco ao respirar “ronqueira” e dificuldade de deglutição são observados; se a localização for ao longo do esôfago e cárdia, serão observados sinais de timpanismo e regurgitamento (DÖBEREINER et al., 1967).

Os sinais clínicos se caracterizam por timpanismo ruminal crônico (SOUTO et al., 2006), tosse (DÖBEREINER et al., 1967; SOUTO et al., 2006), disfagia (SOUTO et al., 2006), regurgitação (DÖBEREINER et al., 1967), diarreia (DÖBEREINER et al., 1967; SOUTO et al., 2006), progressiva perda de escore corporal (DÖBEREINER et al., 1967; SOUTO et al., 2006), pele seca (DÖBEREINER et al., 1967), mucosas pálidas, dificuldade respiratória (DÖBEREINER et al., 1967; SOUTO et al., 2006), edema submaxilar, corrimento nasal (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 2012) e halitose devido à necrose (DÖBEREINER et al., 1967; SOUTO et al., 2006).

À necropsia, observam-se processos neoplásicos variados, múltiplos ou únicos, muitas vezes de grandes extensões, massas amareladas, acinzentadas e infiltrativas, muitas vezes

ulceradas, na base da língua, no esôfago, cárdia e rúmen (TOKARNIA et al., 2012). Associado pode haver proliferações papilomatosas (DÖBEREINER et al., 1967).

Metástases são observadas em linfonodos regionais, e também em órgãos como fígado pulmão, intestino, omento, baço e bexiga (TOKARNIA et al., 1969; JARRET 1978; SOUTO et al. 2006).

Ao exame histopatológico são observados carcinomas epidermoides queratinizados esquisrosos acompanhados de acentuada infiltração linfocitária e papilomas (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 2012), com metástases para linfonodos (SOUTO et al., 2006)

O diagnóstico diferencial deve ser feito com doenças que levam ao aumento de linfonodos da região como actinobacilose, tuberculose e leucose, ou até mesmo corpo estranho localizado na faringe (TOKARNIA et al., 2012).

Não há tratamento para esses processos neoplásicos, mesmo a retirada dos animais de pastos invadidos pela samambaia, não terá qualquer influência sobre a evolução da doença, e a letalidade é de 100% dos animais acometidos (TOKARNIA et al., 2012).

2.2.2 Associação do Papilomavirus bovino (BPV-2) em lesões tumorais de hemátúria enzoótica e carcinomas de trato digestório superior

Há uma possível relação entre o papilomavirus tipo II bovino e os carcinógenos de *P. aquilinum* (JARRET et al., 1978). Campo et al. (1992), após isolar o papilomavirus bovino tipo II (BPV-2) em lesões tumorais de bovinos com HE, sugeriram um sinergismo com o princípio tóxico de *P. aquilinum* no processo de carcinogênese. Sugerem-se que a samambaia tem efeito imunossupressor, e contribui para o desenvolvimento tumoral promovido por esse vírus (FENWICK, 1988; SOUTO et al., 2006). Verificou-se que o vírus está associado aos papilomas de trato digestório superior (HIRONO et al., 1992). No entanto, a presença não é obrigatória para que a haja a transformação do papiloma em carcinoma (CAMPO et al., 1985), e também é possível o desenvolvimento de tumores diretamente do epitélio normal, por uma ação direta dos carcinógenos químicos da samambaia (SOUTO et al., 2006). Campo (1994) após tentar reproduzir experimentalmente a interação entre o papilomavirus e os carcinomas de vias digestórias superiores, concluiu que a imunossupressão relativa à intoxicação pela samambaia é fator determinante na disseminação da papilomatose e que a conversão de papilomas em carcinomas é um fato relacionado à ação carcinogênica da planta.

O BPV-2 não foi encontrado em bexigas sem alterações macroscópicas, provenientes de animais sadios sem o acesso à samambaia (WOSIAKI, 2000). O papilomavirus pode também produzir tumores na parede de bexiga de bovinos sem estes terem acesso à samambaia (OLSON et al., 1965). O BPV-2 é um patógeno capaz de permanecer de forma latente em vários tecidos e foi isolado em urotélio normal, sem qualquer correlação com a HE, naturalmente ou de forma experimental (CAMPO et al., 1992, CAMPO et al., 1999).

2.2.3 Intoxicação por *Pteridium aquilinum* em monogástricos

Para monogástricos, *P. aquilinum* causa intoxicação em função da enzima tiaminase, que inativa, através de clivagem, a molécula de tiamina, a vitamina B₁. Os sinais clínicos observados são neurológicos, cardíacos e neuro-musculares (EVANS, 1963). O rizoma, seguido do broto, são as partes que concentram maior quantidade de tiaminase (TOKARNIA et al., 2012).

Em equinos a intoxicação pela samambaia é rara. A dieta dos animais deve conter 40% de *P. aquilinum* para desenvolver os sinais clínicos (VALLI, 1992). Acredita-se que a má palatabilidade da planta esteja relacionada à baixa incidência de casos de intoxicação nesta espécie. Os animais ingerem a planta preferencialmente em períodos de escassez de pastagens (estação de seca), período que coincide com a rebrota da samambaia, o que contribui para a ocorrência da intoxicação (DINIZ et al., 1984).

Os sinais clínicos apresentados por equinos na intoxicação natural são neurológicos, neuro-musculares e alterações no ritmo cardíaco (EVANS, 1951; EVANS, 1963). Experimentalmente, são descritos sinais clínicos de aumento e alteração no ritmo cardíaco, apatia progressiva com hiporexia e anorexia, incoordenação progressiva, relutância em movimentar-se, aumento da temperatura, sudorese intensa, mioclônias, movimentos de pedalagem e convulsões (FERNANDES et al., 1990; MARTINI-SANTOS, 2010).

Os suínos não manifestam sinais nervosos, os sinais clínicos são discretos, como apatia, anorexia e crescimento retardado (EVANS, 1963; VALLI, 1992). Há aumento de piruvato sanguíneo e reticulocitopenia. Animais intoxicados se recuperam através do tratamento com tiamina (VALLI, 1992).

Em asininos são descritos sinais nervosos de incoordenação de membros posteriores, andar cambaleante, cabeça apoiada, perda de equilíbrio, quedas, batimentos cardíacos e respiração acelerada, com temperatura e mucosas normais (DINIZ et al., 1984).

As lesões macroscópicas descritas em equinos intoxicados experimentalmente são escoriações devido a traumas, edema de tecido subcutâneo, atrofia serosa da gordura, jugular ingurgitada, hidroperitônio, pouco conteúdo estomacal e intestinal com fezes ressecadas no reto, congestão de fígado, rim e baço, pulmão com congestão e edema, hidropericárdio, petéquias no endocárdio e áreas escurecidas no miocárdio (FERNANDES et al., 1990; MARTINI-SANTOS, 2010). Em asininos, Diniz et al. (1984) observaram estado corporal regular, com pelos arrepiados e secos, petéquias e sufusões nas serosas e mucosas, principalmente no estômago, intestino, omento e coração, ulcerações na mucosa gástrica, hiperemia e hemorragias no baço, fígado e rim, estômago e intestinos com pouco conteúdo e com fragmentos de folhas de samambaia junto ao conteúdo. Em suínos foi relatado edema pulmonar e coração mosqueado e dilatado (EVANS et al., 1963).

Microscopicamente há congestão dos órgãos citados (DINIZ et al., 1984; MARTINI-SANTOS, 2010) e áreas de hemorragia no endocárdio (MARTINI-SANTOS, 2010). Fernandes et al. (1990), descreveram ainda necrose coagulativa centro lobular hepática e hepatite difusa discreta, no rim foram observadas nefrite intersticial discreta e nefrose, na bexiga verificou-se cistite ulcerativa necrosante, no coração necrose coagulativa fibrilar, e no cérebro gliose e edema. No SNC de asininos e equinos não foram observadas lesões dignas de nota (DINIZ et al., 1984; MARTINI-SANTOS, 2010). Nos suínos havia áreas de degeneração e necrose no miocárdio (EVANS et al., 1963).

O diagnóstico baseia-se nos sinais e histórico clínico, recuperação com tratamento com tiamina e na comprovação da ingestão de samambaia (DINIZ et al., 1984). O diagnóstico diferencial em equinos deve ser realizado com outras encefalopatias que cursam com alterações clínicas neurológicas como raiva, leucoencefalomalácea e encefalomiélites (TOKARNIA et al., 2012).

2.2.4 Intoxicação por *Pteridium aquilinum* em ovinos

Em ovinos a intoxicação por *P. aquilinum* é de menor incidência, possivelmente, por uma maior resistência à síndrome hemorrágica aguda, ou devido ao seu hábito de pastejo mais seletivo e ingestão de menor quantidade de samambaia (MOON & RAAFAT, 1951, SUNDERMAN, 1987).

Em ovinos são descritos quadros de diátese hemorrágica, hematúria enzoótica, tumores intestinais e degeneração progressiva da retina (PARCKER e McCREA, 1965; HARBUTT e LEAVER, 1969; SUNDERMAN, 1987; FRANÇA et al., 2002).

O quadro hemorrágico em ovinos é semelhante ao quadro em bovinos. A intoxicação natural foi descrita na Inglaterra, onde em poucas semanas, morreram 13 ovinos de um lote de 43 animais. Ocorreu, durante os meses de agosto e setembro, em um período de severa estiagem, com escassez de pastagem e grande infestação de *P. aquilinum* (PARCKER e McCREA, 1965). Na Austrália, morreram 120 ovinos de um lote de 450, mantidos em pastagens infestadas por *P. esculentum* (SUNDERMAN, 1987).

Os sinais clínicos observados são perda de peso, letargia, depressão, anemia e diarreia com sangue. À necropsia encontram-se hemorragias em diversos órgãos e cavidades, e ao exame histológico, hemorragia e congestão, hemossiderose no baço e fígado, com ausência de tecido hematopoético na medula óssea (PARCKER e McCREA, 1965; SUNDERMAN, 1987). Experimentalmente, a doença foi reproduzida pela administração da planta fresca durante 64 a 66 dias, e com a planta dessecada, durante 16, 33 e 70 dias (MOON e RAAFAT, 1951).

A degeneração progressiva da retina, conhecida como “bright blindness” é caracterizada por uma atrofia da retina, com aumento da refletância do *tapetum lucidum*, o qual aparece como um espelho no exame oftalmoscópico, com cegueira bilateral e permanente (WILCOCK, 2007). As lesões são restritas à retina, há destruição completa dos cones, da camada nuclear externa e de porções da camada nuclear interna (WATSON et al., 1972). Ocorre principalmente na Grã-Bretanha, determinada pela ingestão de *P. aquilinum* em ovinos de 3 a 4 anos de idade (WATSON et al., 1965; WILCOCK, 2007); os animais adotam uma atitude de alerta (WATSON et al., 1972).

2.2.5 Intoxicação por *Pteridium aquilinum* em humanos

Os meios de exposição humana ao princípio tóxico da samambaia são através da ingestão direta da planta (PAMUCKU e PRICE, 1969; SANTOS et al., 1986; FENWICK, 1988), contato físico com os esporos (SIMÁN et al., 1990), ingestão de produtos de origem de animais mantidos em áreas infestadas por *P. aquilinum*, entre eles laticínios (ALONSO-AMELOT et al., 1993) e carne, ou até mesmo por ingestão de água de reservatórios de locais altamente infestados (EVANS 1987; FENWICK 1988).

A samambaia é consumida em quantidades significativas em algumas partes do mundo, como no Japão, nordeste dos Estados Unidos, no Canadá, na China, na Sibéria (FENWICK, 1988) e no Brasil (SANTOS et al., 1986; FREITAS, 2001). No Japão há uma maior incidência de câncer estomacal onde há o hábito do consumo de brotos cozidos (PAMUCKU e PRICE 1969). Estima-se que o risco de câncer de trato digestório é de 5 a 8% maior em pessoas que tem esse hábito, do que em pessoas que não consomem esse tipo de alimento (ALONSO-AMELOT e AVENDANO, 2002).

No Brasil, na região de Ouro Preto, Minas Gerais, o broto da samambaia é amplamente consumido. A planta é coletada nos meses chuvosos, entre outubro e maio, e é preparado fervendo-se por três vezes em água com uma pitada de bicarbonato de sódio para diminuir o sabor amargo. Costuma ser servido com carne e pode ser encontrado em alguns restaurantes da região de Ouro Preto e Belo Horizonte, onde também é encontrado, no comércio, no mercado central (SANTOS et al., 1986; FREITAS, 2001). Este hábito também é observado em populações orientais nas cidades de São Paulo, SP e na região norte do Paraná (CRUZ e BRACARENSE, 2004).

A água da fervura dos brotos retém sua ação cancerígena (HIRONO et al., 1970). Quando administrada em ratos pode induzir a formação de neoplasias. Em ratos que receberam a planta fresca, todos desenvolveram tumores. Em ratos, que receberam a planta após imersão em água fervente por cinco a dez minutos, a taxa de tumores de íleo ficou em 75% (HIRONO et al., 1970; HIRONO et al., 1972).

A ingestão de água de reservatórios obtidas por lixiviavão de áreas muito invadidas pode conter o princípio tóxico e é uma fonte potencial da incidência de processos neoplásicos em humanos (EVANS, 1987; FENWICK, 1988).

A inalação de esporos pode ser uma eventual exposição aos carcinogênicos da samambaia em relação ao câncer gástrico (SIMÁN et al., 1999); os esporos demonstraram-se mutagênicos *in vitro* e *in vivo*, porém não foi constatada a presença de ptaquilosídeo (GIL da COSTA et al., 2012).

O leite proveniente de vacas que se alimentam regularmente com brotos de samambaia, contém ptaquilosídeo (ALONSO-AMELOT et al., 1993) e causa câncer em roedores (EVANS et al., 1972; VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1990); a concentração do ptaquilosídeo no leite corresponde a 8,5% da quantidade ingerida pelo animal (ALONSO-AMELOT et al., 1996).

2.3 Gênero *Clostridium*

As bactérias do gênero *Clostridium*, pertencem à família Bacillaceae, que compreende microorganismos anaeróbios restritos, formadores de esporos (KRIEK e ODENTAAL, 1994).

Os clostrídios são bastonetes Gram positivas, grandes, fermentativas, catalase-negativas, oxidases positivas, que requerem meios enriquecidos para crescer. São bacilos retos ou levemente curvos, e a maioria possui motilidade pela presença de flagelos peritríquios (QUINN et al., 2005). A esporulação é uma característica importante do gênero *Clostridium* e corresponde ao mecanismo mais eficiente de sobrevivência do mesmo (KRIEK & ODENDAAL, 1994). Estes endosporos podem ser usados para diferenciação de espécies de *Clostridium* (QUINN et al., 2005).

As bactérias deste gênero são encontradas na pastagem, no solo, na água, e em alimentos de origem animal e vegetal; são ainda isoladas de vísceras de animais sadios e habitam o trato digestório do homem e dos animais (KRIEK e ODENTAAL, 1994).

Mais de 100 espécies de *Clostridium* spp. são conhecidas, porém menos de 20 são patogênicas (Tabela 1). Conforme a patogenicidade, são agrupados com base na atividade das toxinas por eles produzidas e nos tecidos que afetam. *Clostridium tetani* e *C. botulinum* são clostrídios neurotóxicos, afetam a função neuromuscular sem indução de lesão tecidual. Os clostrídios histotóxicos, são os que produzem lesões relativamente localizadas em tecidos, como músculo e fígado, e podem causar ainda toxemia.

Clostridium spp. chamados de histotóxicos produzem uma variedade de lesões em animais domésticos. As toxinas elaboradas por essas bactérias em replicação induzem necrose tecidual local e efeitos sistêmicos que podem ser fatais. Alguns *Clostridium* estão presentes como esporos latentes e produzem doença clínica após germinação. Os principais clostrídios histotóxicos causadores de doenças são o *C. chauvoei*, o *C. septicum*, o *C. novyi* (tipo B) e o *C. haemoliticum*, bactérias que causam respectivamente o carbúnculo sintomático, o edema maligno, a hepatite necrótica infecciosa (*Black disease* ou doença negra) e a hemoglobinúria bacilar (RADOSTITS et al., 2002). Ainda há os *Clostridium perfringens* tipos A até E, que produzem lesões inflamatórias no trato gastrointestinal, características da enterotoxemia (QUINN et al., 2005).

Clostridium chauvoei e *C. septicum* são os clostrídios envolvidos nas mionecroses, que se caracterizam por infecções necrosantes em tecidos moles e na musculatura.

O edema maligno ocorre quando há a contaminação de feridas por bactérias (RADOSTITS et al., 2002), que produzem várias toxinas, das quais a mais importante é a alfa toxina que tem ações hemolítica e necrosante (JONES et al., 2000), que causa danos no endotélio vascular e na membrana plasmática muscular (PERDRIZET, 1987).

Tabela 1. Espécies de *Clostridium* spp. com importância veterinária

Clostrídios neurotóxicos	Clostrídios histotóxicos	Clostrídios enteropatogênicos e produtores de enterotoxemia	Outros Clostrídios
<i>C. tetani</i> <i>C. botulinum</i> (tipos A-G)	<i>C. chauvoei</i> <i>C. septicum</i> <i>C. novyi</i> (tipo A) <i>C. perfringens</i> (tipo A) <i>C. sordellii</i> <i>C. haemoliticum</i> <i>C. novyi</i> (tipo B)	<i>C. perfringens</i> (tipos A-E)	<i>C. colinum</i> <i>C. difficile</i> <i>C. piliforme</i> <i>C. spiroforme</i>

Fonte: adaptado de QUINN et al. 2005.

O carbúnculo sintomático ocorre quando há a germinação e multiplicação de esporos latentes presentes na musculatura, após esta sofrer um processo traumático, que resulta em áreas com baixo potencial de oxi-redução. As células vegetativas crescem, fermentam o glicogênio muscular, digerem proteínas e produzem exotoxinas e gases (STEPHEN e PIETROWKI, 1986).

As mionecroses atingem todas as espécies de animais, mas principalmente equinos, ovinos e bovinos (JONES et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002)

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho desenvolveu-se em quatro etapas: estudo retrospectivo dos casos de intoxicação por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*, acompanhamento de casos e surtos da doença durante janeiro de 2011 a junho de 2014, reprodução experimental da doença, e isolamento bacteriano e identificação dos bastonetes encontradas nos infartos, na intoxicação aguda por *P. arachnoideum*.

3.1 Estudo Retrospectivo

O estudo retrospectivo foi realizado através de levantamento de todos os casos de intoxicação por *P. arachnoideum*, registrados no Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), sob a forma de material enviado e da realização de necropsias pelo setor. Este levantamento abrange os anos de 1988 a dezembro de 2010. Os casos encontrados foram agrupados de acordo com as três formas de intoxicação: diátese hemorrágica, hematúria enzoótica e carcinomas de vias digestórias superiores.

Dentre a intoxicação aguda, foram revisados todos os casos registrados em relação ao período do ano que ocorreram e as principais lesões macroscópicas e microscópicas.

3.2 Surtos Acompanhados de Intoxicação Aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*

No período entre janeiro de 2011 a junho de 2014, através de atendimentos solicitados por médicos veterinários ao Laboratório de Patologia Animal do CAV-UDESC, foram acompanhados 9 surtos de intoxicação aguda. Em um dos casos, foi possível o acompanhamento das manifestações clínicas e em 8 casos foram realizadas a necropsia e coleta de histórico.

3.2.1 Coleta de históricos

O histórico era fornecido pelos criadores e/ou veterinários em visitas às propriedades. Nesta ocasião também se verificou a ocorrência da samambaia e se havia o seu consumo.

3.2.2 Caso clínico acompanhado

Foi acompanhado um caso clínico de intoxicação aguda por *P. arachnoideum*. O bovino foi recebido no LAPA, com suspeita de tristeza parasitária bovina; acompanhou-se a evolução dos sinais clínicos até a morte, e se realizou a necropsia.

3.2.3 Realização de necropsias

As necropsias foram realizadas nas dependências do LAPA e nas propriedades em que havia solicitação de atendimento pelos veterinários. Foram registradas as lesões macroscópicas, coletadas amostras para histologia e amostras de infartos para isolamento microbiológico.

3.2.4 Histologia

Para histologia, amostras de vísceras coletadas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 72 horas. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de três micrômetros de espessura, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) foram examinados em microscópio óptico. Adicionalmente, quando necessário, realizou-se as colorações de Gram histológico e de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (PROPHET et al., 1992).

3.3 Reprodução Experimental

A reprodução experimental da doença que foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA do CAV-UDESC), e registrada sob o número 01.09.11, e foi realizada nas dependências do Laboratório de Patologia Animal do CAV-UDESC.

3.3.1 Coleta e administração de brotos de samambaia

Para reprodução experimental, foram coletados brotos únicos e hastes superiores com as folhas mais novas de *P. arachnoideum* (Figuras 2A-C). A coleta foi realizada na localidade de Três Árvores, município de Lages, região Serrana do Estado de Santa Catarina. Esta região apresenta clima subtropical, altitude de 900metros, temperatura média anual em torno de 15°C e pluviosidade de aproximadamente 1300mm por ano.

A coleta foi realizada em uma área onde havia plantação de eucaliptos (*Eucalyptus globulus*) e em outra área em beiradas de estradas. Na primeira área parte do terreno era sombreada e a outra parte tinha boa incidência solar; a segunda área tinha constante incidência de sol.

A planta era colhida duas ou três vezes por semana, pesada nas quantidades necessárias para cada animal, armazenada em sacos abertos, em sala arejada, e em temperatura ambiente.



Figura 2. *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Planta com brotação. **B.** Broto. **C.** Local de coleta de brotos de samambaia, localidade de Três Árvores, Lages, SC.

3.3.2 Animais utilizados

Foram utilizados quatro bovinos, dois machos (Bovinos 1 e 2), da raça Holandês, com pesos médios de 200kg e 227kg e duas fêmeas (Bovinos 3 e 4), mestiças, com pesos médios de 102kg e 113kg.

O delineamento experimental consta na Tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental da intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em bovinos

Nº Bovino	Raça e sexo	Vacina	Idade (meses)	Dose	Início do experimento	Fim do experimento	Total de dias em experimentação
1	Holandês Macho	Sim	17	20g/kg	1.11.2013	23.1.2014	85 dias
2	Holandês Macho	Sim	16	20g/kg	1.11.2013	4.2.2014	96 dias
3	Mestiça Fêmea	Não	8	14g/kg	3.12.2013	19.1.2014	47 dias
4	Mestiça Fêmea	Não	8	10g/kg	3.12.2013	19.2.2014	78 dias

3.3.3 Manejo dos animais

Os Bovinos 1 e 2 foram vacinados com vacina Poli-star (Vallée), composta por cultura inativada de *Clostridium chauvoei* e toxoides de *C. botulinum* tipo C e D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* tipo B, C e D e *C. sordelli*. Os Bovinos 3 e 4 não foram vacinados.

Os Bovinos 1 e 2 recebiam a planta pela manhã, picada e misturada com aproximadamente 100g de ração no cocho. Após ingerirem toda a planta eram soltos no piquete e recolhidos no final do dia, quando permaneciam em baias fechadas durante à noite, com água à vontade, até o dia seguinte.

Os Bovinos 3 e 4 permaneceram em baias de alvenaria fechadas durante todo o experimento devido ao comportamento agressivo. O Bovino 3 recebia a planta picada misturada com pequena quantidade de pastagem e o Bovino 4 recebia a planta com ração. Estes dois bovinos recebiam a samambaia dividida em porções de aproximadamente um terço da dose programada, que só era repostada quando boa parte da anterior havia sido consumida. A sobra era pesada na manhã do dia seguinte, anteriormente ao início da administração do dia. No final da tarde, recebiam capim quicuiu (*Penisetum clandestinum*) no cocho.

Os Bovinos 1 e 2 ingeriram dose diária de 20g/kg e os Bovinos 3 e 4 ingeriram doses de 14g/kg e 10g/kg, respectivamente, devido ao comportamento agressivo e ao fato de não consumirem toda a planta.

Os animais em experimentação eram avaliados diariamente, em relação às características das fezes, urina, apetite, comportamento, temperatura e à coloração das mucosas.

Amostras de sangue foram coletadas semanalmente dos Bovinos 1 e 2, e uma vez anterior a morte dos Bovinos 3 e 4. A coleta foi realizada na veia coccígea, em frascos com anticoagulante ácido etileno diamina tetra acético (EDTA), armazenadas em caixa isotérmica com gelo e enviados ao laboratório. As amostras foram analisadas em laboratório particular, pelo método Celldyn 3700 – Abbott/Microscopia.

Os animais foram acompanhados até a morte ou eutanasiados *in extremis* e a necropsia realizada logo após. Amostras de vísceras foram coletadas para a histologia e para o isolamento microbiológico.

3.4 Exame Microbiológico e Isolamento Bacteriano

As amostras de regiões com infartos, coletadas durante as necropsias, foram armazenadas congeladas em sacos plásticos, devidamente identificadas, para o isolamento bacteriano e inoculação em camundongos.

O processo de isolamento bacteriano foi realizado no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP - Campus de Araçatuba, São Paulo, conforme técnicas padrões do laboratório.

3.4.1 Isolamento bacteriano

Para isolamento bacteriano, foi usado o meio de cultura Tarozzi, que usa caldo simples, que contém para 1 litro de água destilada, 3g de extrato de carne, 10g de peptona e 5g de cloreto de sódio e fragmentos de fígado de aproximadamente 0,5cm.

Para preparo do caldo, ferveu-se por meia hora, em vapor fluente, os fragmentos de fígado, posteriormente, filtrou-se o caldo e os fragmentos de fígado foram lavados para desgrudarem. Estes foram distribuídos em tubos grossos, com uma camada de 3cm de fragmentos de fígado e meio tubo de caldo. Adicionou-se por fim, 0,5 a 1,0ml de vaselina sólida fundida. Os tubos foram autoclavados por meia hora à temperatura de 110°C para esterilização.

Fragmentos de aproximadamente 3mm das áreas de infarto foram introduzidos no meio de cultura Tarozzi, entre os fragmentos de fígado (Figura 3A). Após esse procedimento os tubos permaneceram em Banho-Maria à 80°C, durante 30 minutos, e posteriormente á estufa a 37°C. Procedeu-se a leitura após 24 horas.

3.4.2 Inoculação em camundongo

Foram inoculados 0,2ml do meio de cultivo Tarozzi, após 24 horas, por via subcutânea na região abdominal de 43 camundongos (Figura 3B). Após a inoculação, estes foram identificados e colocados em caixas com maravalha, água e ração, e acompanhados por um período de 48 horas.

Nos camundongos que morreram ou que foram eutanasiados após 48horas, foi realizada a impressão da cápsula do fígado e em seguida a necropsia. Todos os órgãos foram coletados para histologia e uma amostra dos fígados dos camundongos que morreram naturalmente, foi coletada para a identificação por reação em cadeia de polimerase (PCR).

Para eutanásia dos camundongos utilizou-se sobredose de anestésicos dissociativos, 100mg/kg de quetamina e 10mg/kg de xilazina via intraperitoneal.

A impressão de fígado consistiu em encostar uma lâmina de vidro na cápsula do fígado, fixa-la em chama e corar com coloração de Gram. Após a coloração, as lâminas foram examinadas em microscópio ótico.

As amostras para histologia foram processadas rotineiramente e coradas com hematoxilina e eosina.

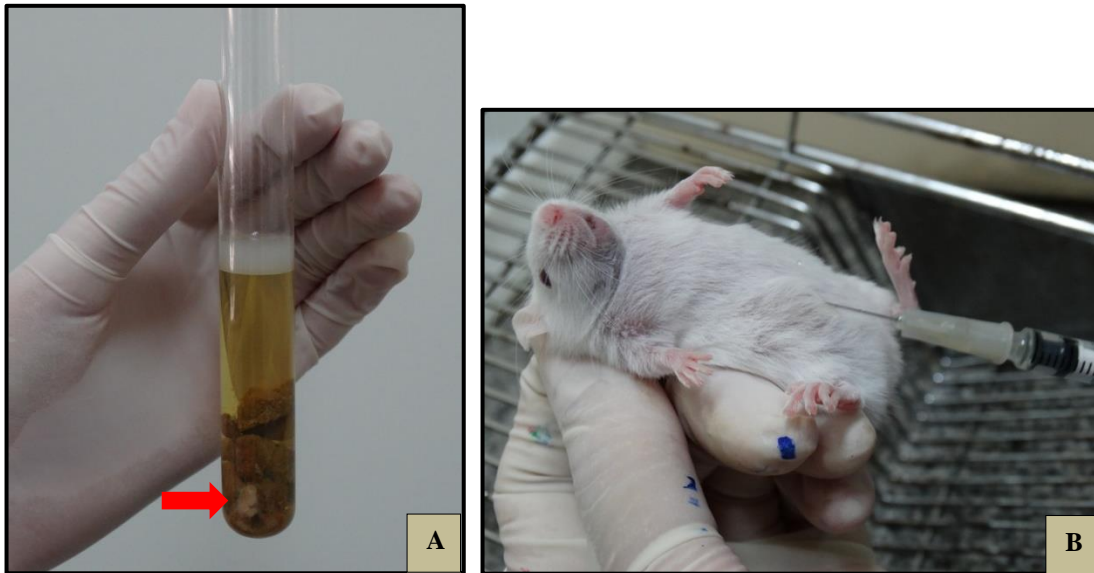


Figura 3. Cultivo e inoculação em camundongo de bactérias envolvidas nos infartos de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Fragmento de amostra de pulmão com infarto introduzido entre os fragmentos de fígado (seta) no meio de cultura de Tarozzi. **B.** Inoculação por via subcutânea na região abdominal de camundongo do meio de cultura de Tarozzi após 24 horas de cultivo.

3.4.3 Cultivo em ágar sangue

Os meios de cultivo em Tarozzi foram semeados em placa contendo ágar sangue de carneiro a 5%, em condições de anaerobiose, em jarra de McIntosh & Fields a 37°C por 24 horas. Após o período de 24 horas de incubação, as colônias foram observadas com relação ao aspecto, coloração, presença e tipo de hemólise.

Do crescimento total de cada placa, foram coletadas amostras das colônias em água ultrapura para identificação por PCR.

3.4.4 Identificação da espécie envolvida por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A análise por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), conforme descrita por Sasaki et al. (2002).

As amostras selecionadas foram as que causaram a morte dos camundongos após a inoculação subcutânea. Foram utilizadas as amostras de fígado de camundongos inoculados, os meios de cultivo de Tarozzi onde o fígado dos camundongos foi inoculado, e os raspados do crescimento bacteriano total da placa de ágar sangue.

Foram utilizados os Camundongos 23, 29, 31, 34 e 44.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo Retrospectivo

O número de surtos registrados de intoxicações por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* no Laboratório de Patologia Animal CAV-UDESC consta na Tabela 3. A maioria dos casos de intoxicação pela samambaia, consistiram da forma aguda, seguida pelas intoxicações crônicas de carcinomas de trato digestório superior e de tumores de bexiga (Figuras 4 e 5).

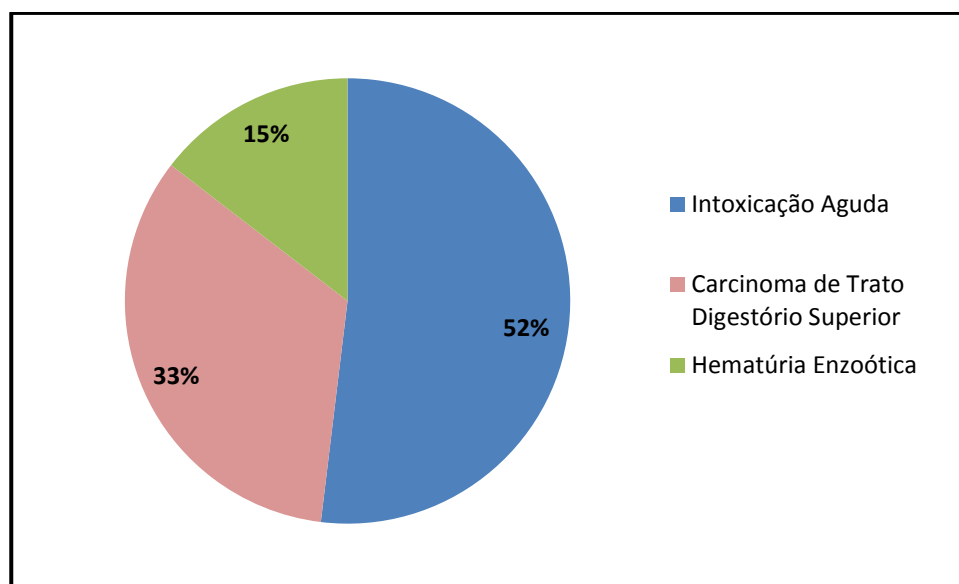


Figura 4: Distribuição das formas de intoxicações por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em bovinos no estado de Santa Catarina, entre os anos de 1988-2010.

De todos os materiais, 271 foram casos de intoxicação aguda por *P. arachnoideum*, 175 casos foram de diagnóstico de carcinomas escamosos do trato digestório superior e 76 foram de tumores da bexiga.

A intoxicação aguda ocorreu durante o ano todo, com maior concentração no outono, com 109 casos (40%), nas demais estações o número de casos foi semelhante, na primavera 51 (19%), no verão 61 (23%) e no inverno 50 casos (18%) (Figura 6).

Tabela 3. Número total de surtos de bovinos registrados no Laboratório de Patologia Animal do CAV/UEDESC, total de casos de intoxicação por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*, totais de intoxicação aguda, de carcinomas do trato digestório superior e de hematúria enzoótica no período entre 1988 a 2010

Ano	Total de casos de bovinos registrados	Total por ano de intoxicação por <i>Pteridium (aquilinum) arachnoideum</i>	Intoxicação aguda	Carcinomas de trato digestório superior	Hematúria enzoótica	
1988	95	8	2	2	4	
1989	155	11	4	6	1	
1990	125	13	5	7	1	
1991	157	8	1	5	2	
1992	178	8	4	2	2	
1993	257	6	1	3	2	
1994	245	15	5	8	2	
1995	304	30	14	10	6	
1996	338	20	7	6	7	
1997	384	16	10	6	0	
1998	528	19	9	10	0	
1999	614	24	11	6	7	
2000	736	24	12	11	1	
2001	800	66	47	16	3	
2002	964	39	18	14	7	
2003	826	35	23	9	3	
2004	724	25	18	4	3	
2005	676	52	33	14	5	
2006	629	27	11	11	5	
2007	557	15	8	6	1	
2008	508	20	9	6	5	
2009	537	18	9	5	4	
2010	474	27	14	8	5	
Total	23	10811	526	275	175	76

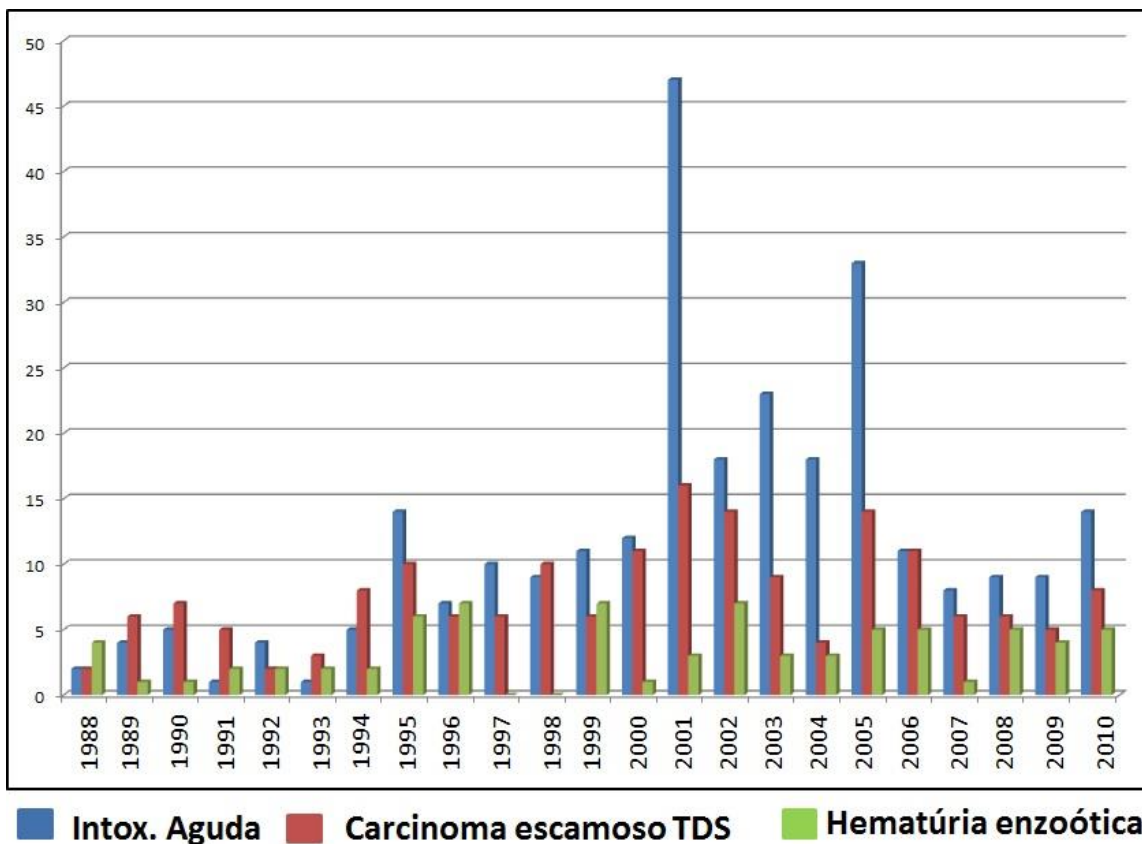


Figura 5. Distribuição das formas de intoxicação por *Pteridium arachnoideum* por ano no período de 1988 a 2010.

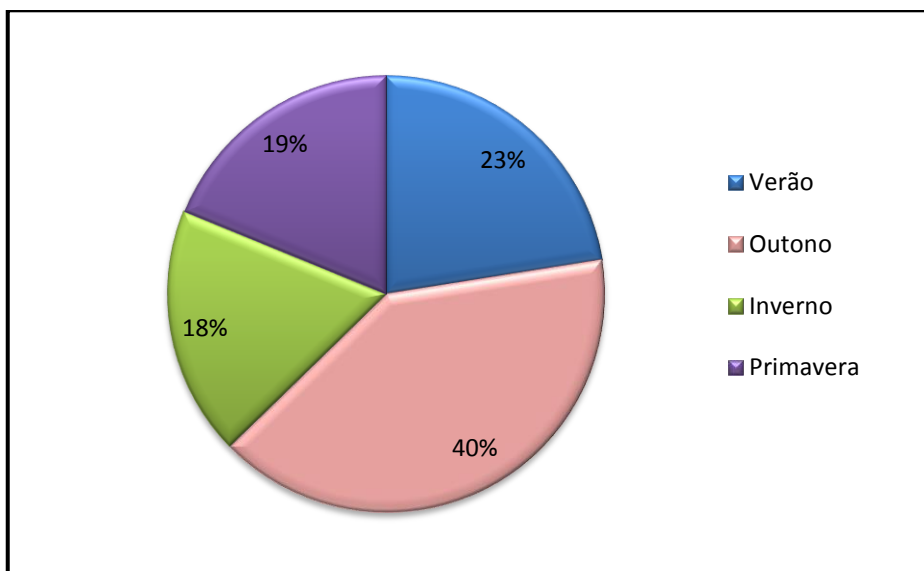


Figura 6. Distribuição dos casos de intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* por estações do ano.

Os casos ocorridos incluem materiais enviados ao LAPA para diagnóstico e as necropsias realizadas pelo setor de patologia animal.

Nos históricos de intoxicação aguda, as informações se referiam à morte de animais com febre, acima de 40° C, anemia, e fezes ou diarreia com sangue.

As lesões macroscópicas eram caracterizadas por hemorragias com graus variáveis de extensão e distribuição, desde o tecido subcutâneo até a musculatura esquelética, cardíaca, em serosas e em mucosas, petéquias nas meninges do sistema nervoso central e medula espinhal (Figura 7A). Foram observados edema de linfonodos (Figuras 7C e D), abomaso (Figuras 7E e F) e hemorragia de lobo renal (Figura 7B). No intestino, foram visualizadas hemorragias desde a serosa até a mucosa, coágulos no lúmen (Figuras 8A, B e C), áreas de aderência de alças intestinais com deposição de fibrina (Figura 8D), mucosa avermelhada com áreas erosivas (infarto) (figura 8E) e edema de parede (Figura 8F). Infartos foram encontrados principalmente no fígado, e caracterizados por áreas branco-amareladas de bordos irregulares de tamanhos variados, de milímetros a alguns centímetros, com distribuição aleatória, atingindo a cápsula e o parênquima (Figuras 9A a D). Os infartos também foram observados no pulmão e intestino. Úlceras foram encontradas no rúmen (Figura 9E) e abomaso (Figura 9F). Na bexiga foram observadas petéquias na serosa e mucosa e coágulos na mucosa.

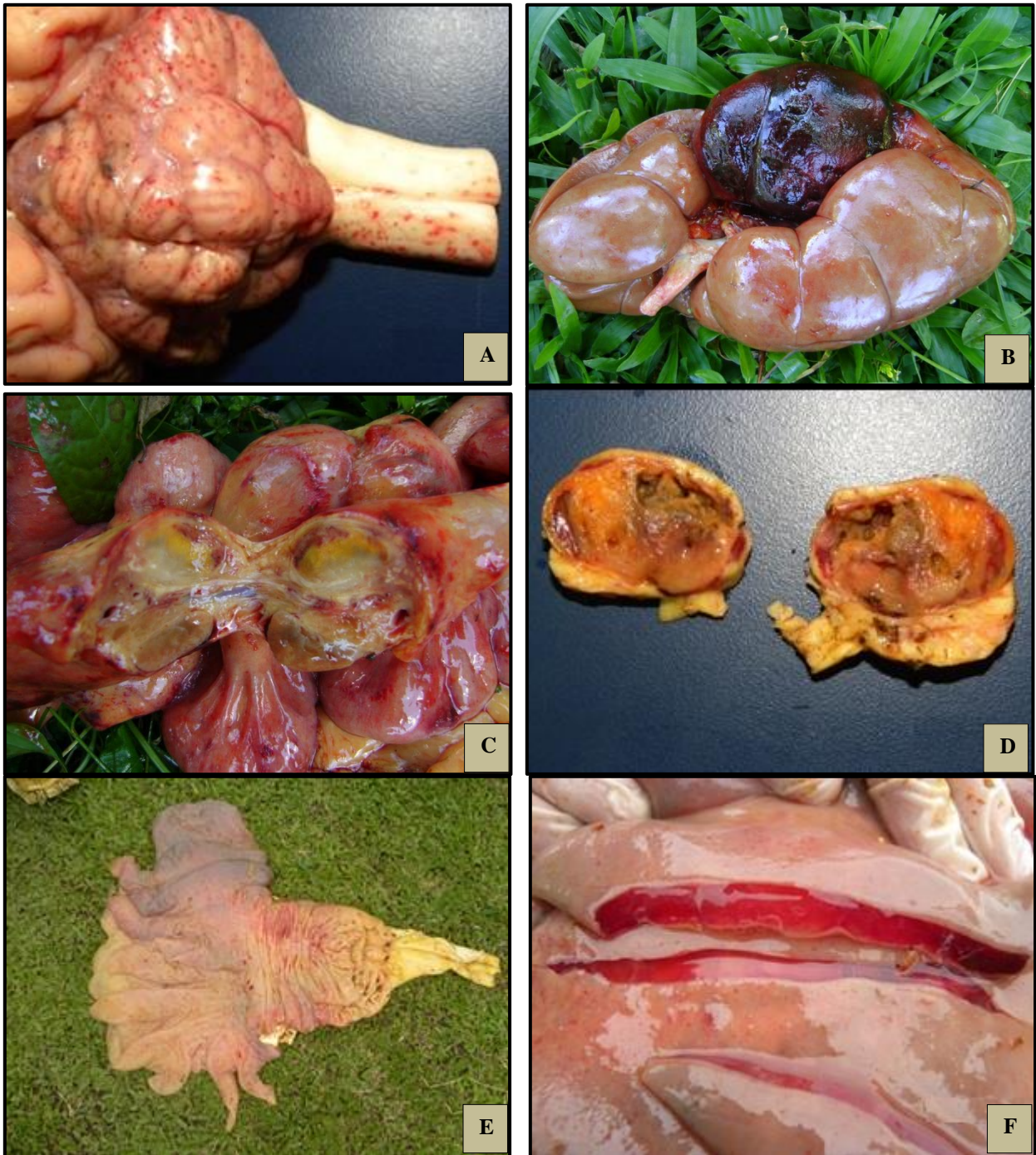


Figura 7. Órgãos de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados. **A.** Cerebelo e ponte com petéquias na meninge. **B.** Rim com lobo hemorrágico devido a um infarto. **C.** Linfonodos mesentéricos brilhantes (edema). **D.** Superfície de corte de linfonodos com necrose. **E.** Edema de parede do abomaso. **F.** Superfície de corte de E, evidencia o acentuado edema hemorrágico da parede do abomaso.

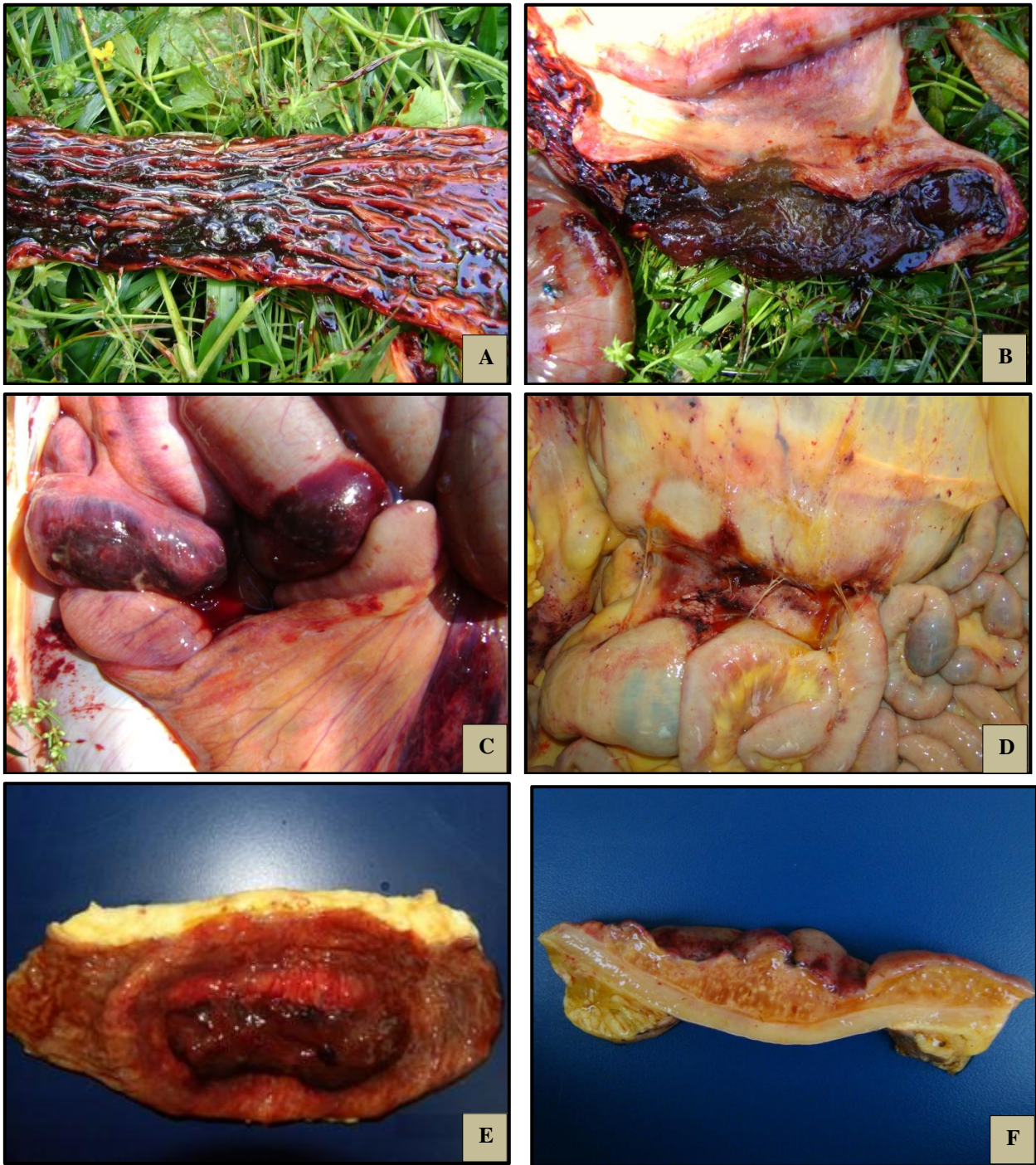


Figura 8. Intestino delgado de bovinos na intoxicação por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados. **A.** e **B.** Mucosa difusamente vermelha com sangue e coágulos. **C.** Hemorragias na serosa. **D.** Aderência de alças intestinais com deposição de fibrina e hemorragia. **E.** Mucosa vermelha com área erosiva (infarto). **F.** Corte longitudinal do intestino com edema acentuado em todas as camadas.

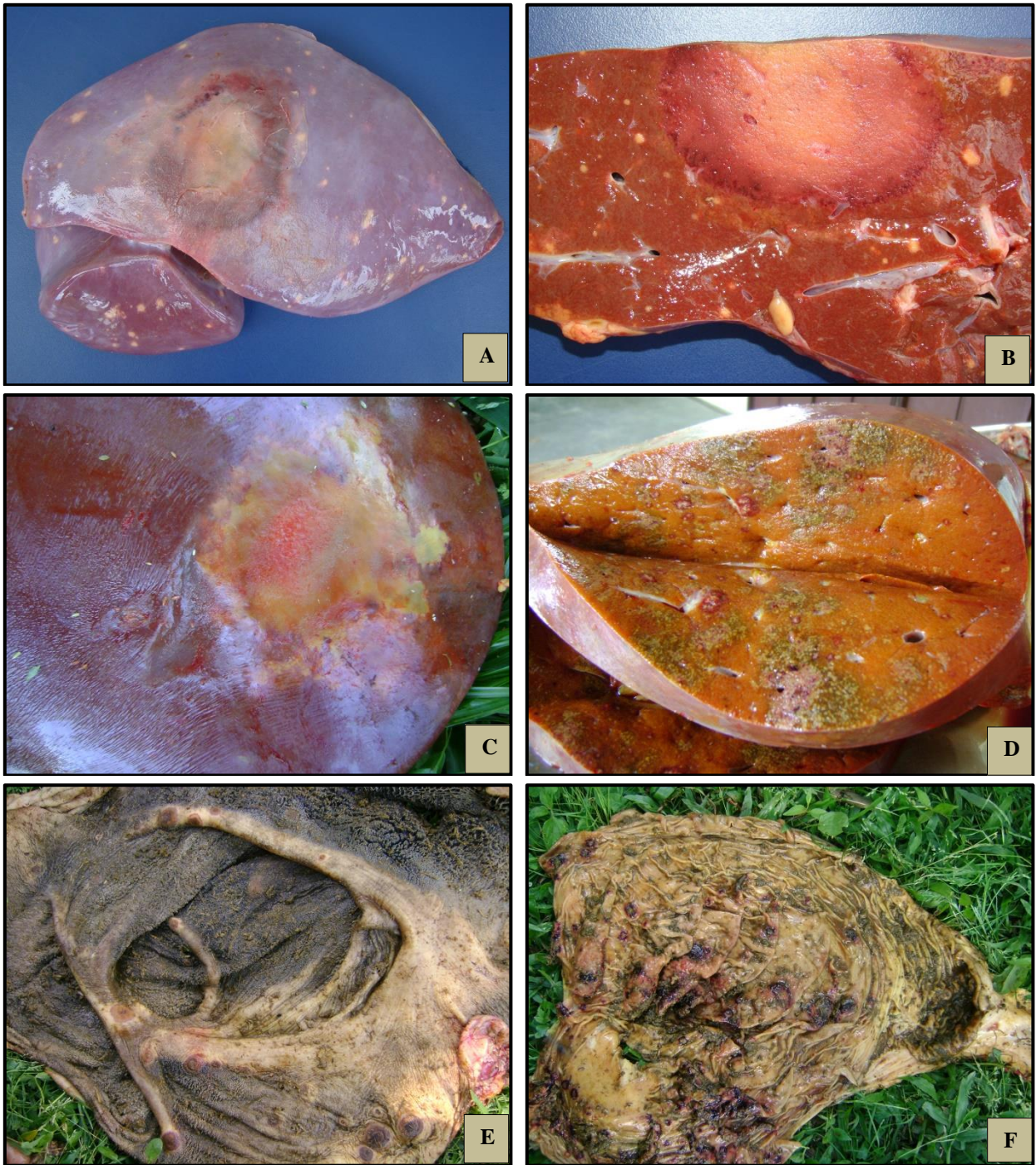


Figura 9. Infartos de fígado, rumen e abomaso de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum*. Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados. **A.** Fígado de bovino enviado ao frigorífico, grande infarto na cápsula na face diafragmática. **B.** Superfície de corte de A. **C.** Infarto na superfície capsular. **D.** Pequenos infartos multifocais no parênquima. **E.** Mucosa do rúmen com múltiplas úlceras. **F.** Mucosa do abomaso com múltiplas ulcerações.

As principais lesões histológicas encontradas constam na Tabela 4. De todos os casos, 126 (46,5%) apresentavam medula óssea com rarefação ou ausência de tecido hematopoético; de 145 casos (53,5%) não foram processados medula óssea; nestes foram constatadas lesões de fígado e/ ou outros órgãos, compatíveis com a intoxicação aguda.

As hemorragias vistas à macroscopia, em diferentes órgãos, também foram observadas à histologia (Figura 10A). Em um caso, o timo apresentou necrose de coagulação com agregados de bastonetes Gram positivos (Figuras 10B e C). As lesões de fígado se caracterizavam por necrose de coagulação centrolobular, circundada por hepatócitos com degeneração vacuolar, e infartos com agregados bacterianos associados, algumas das vezes com bolhas de gás (Figuras 10D a F). No pulmão foram observadas hemorragia, fibrina, com ou sem infiltrado polimorfonuclear e agregados bacterianos. No rim e baço também havia necrose e agregados bacterianos. Nos linfonodos mesentéricos havia necrose, edema e hemorragia, alguns com formação de gás. Não havia infiltrado inflamatório nas lesões.

Tabela 4. Principais lesões histológicas encontradas em bovinos com intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*

	Hemorragia	Necrose de coagulação	Agregados bacterianos	Exsudação de fibrina	Rarefação de tecido linfoide	Enfisema	Rarefação de tecido hematopoético
Glândula salivar		X	x				
Língua		X					
Palato		X	x				
Rúmex	x	X	x	x			
Abomaso	x	X	x				
Intestino	x	X	x	x	x		
Pulmão	x	X	x	x			
Coração	x	X		x			
Timo		X	x				
Fígado	x	X	x			x	
Baço	x	X	x			x	
Linfonodo	x	X	x	x	x	x	
Rins	x		x				
Bexiga	x	X	x				
Medula óssea	x						x

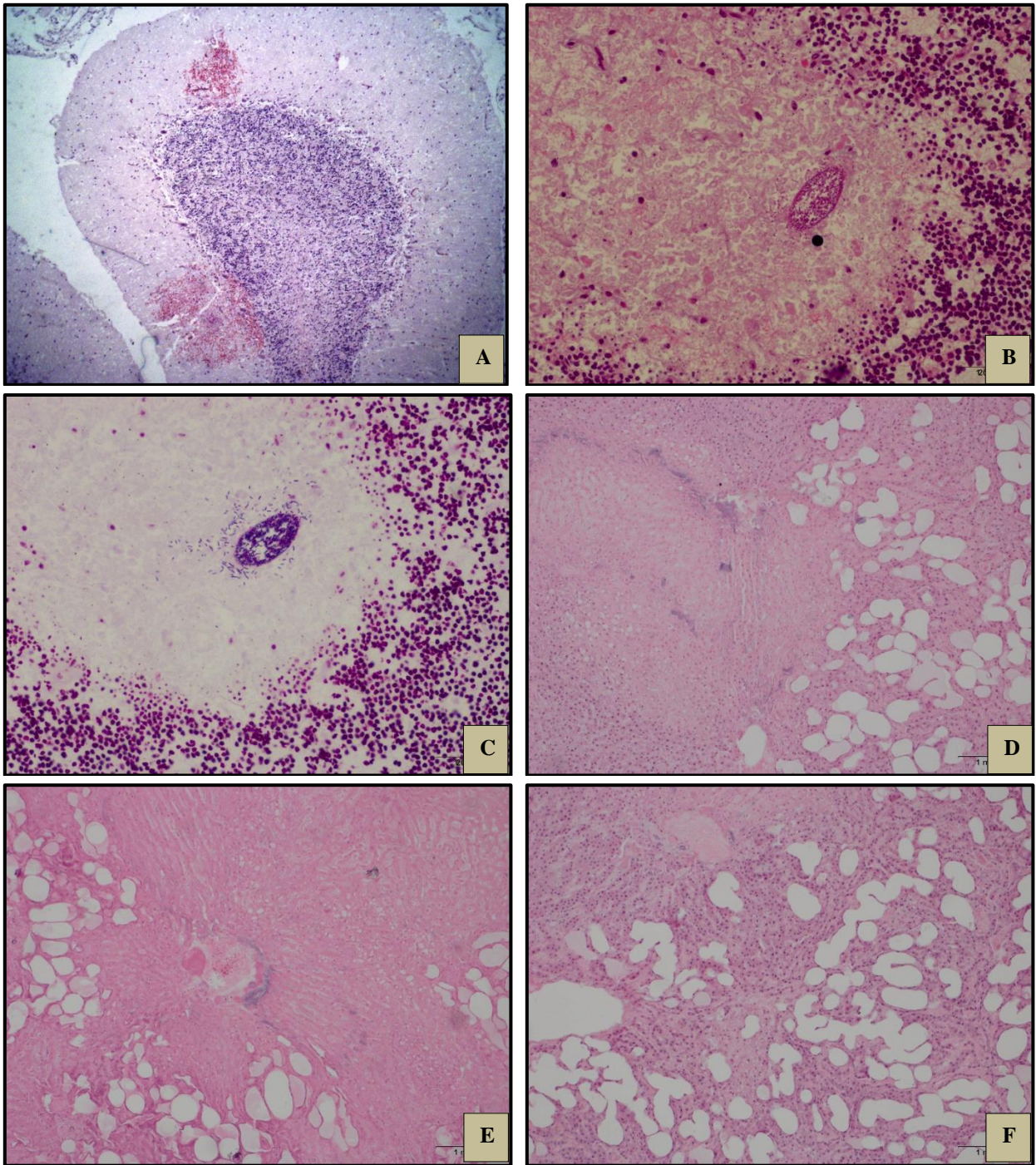


Figura 10. Lesões histológicas em órgãos de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. Necropsias realizadas pelo LAPA e materiais enviados. **A.** Cerebelo com hemorragia multifocais (HE, obj 4). **B.** Timo com área focal de necrose de coagulação e agregados bacterianos (HE, obj. 10). **C.** Evidenciação de bacilos Gram positivos (Gram, obj. 10). **D.** Fígado com área de necrose de coagulação, agregados bacterianos e bolhas de gás (HE, obj.4). **E.** Bolhas de gás em região de necrose, associada a agregados bacterianos (HE, obj. 10). **F.** Bolhas de gás entre hepatócitos (HE obj. 10).

4.2 Caso Clínico e Realização de Necropsias de Casos de Intoxicação Aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* Durante o Período de Janeiro de 2011 a Junho de 2014

4.2.1 Caso clínico

Um bovino fêmea, da raça Devon, com 1,5 anos de idade, foi enviado ao laboratório de patologia com o histórico de tristeza parasitária, no início de dezembro de 2012. Já havia morrido na fazenda seis animais com os mesmos sinais clínicos, sem realização de necropsias. A propriedade, de onde o animal era oriundo, se caracterizava por aptidão para gado de corte, e localizava-se na localidade de Coxilha Rica, Lages. Em visita à propriedade observou-se grande quantidade de brotos de samambaia consumidos. O lote de 50 animais estava em um piquete de campo nativo, havia 15 a 20 dias.

O bovino morreu 44 horas e 10 minutos após sua chegada ao laboratório. Ao ser descarregado, o bovino debateu-se e o chifre direito perdeu a camada córnea, que sangrou por aproximadamente 24 horas (Figuras 11A e B). Quando o animal chegou, possuía comportamento agressivo, febre de 40° e mucosas pálidas. Posteriormente a temperatura baixou em torno de 38,5°C e antes de morrer em 37,8°C.

Após 30 horas, permanecia longos períodos em decúbito, mas se levantava com estímulos, mantinha-se alerta, porém mais calmo, havia petéquias nas mucosas ocular e oral, com hemorragia na gengiva dos alvéolos dentários (Figura 11C).

Quatro horas antes da morte começou a apresentar salivação, respiração ofegante, plano nasal úmido, extremidades e corpo frios. Duas horas antes de morrer, apresentou decúbito lateral, ainda com retorno ao decúbito esternal. Uma hora antes da morte apresentou nistagmo, dificuldade respiratória grave e progrediu para morte.

O hemograma revelou diminuição das plaquetas (17mil /uL – Valor de Referência (VR) 140 a 400mil/uL), hematócrito baixo (23,70% - VR 35-47%) e os eritrócitos dentro da normalidade (4,9milhões/uL – VR 3,9-5,4milhões/uL); o leucograma estava dentro da normalidade.

À necropsia, foram observadas palidez das mucosas e petéquias na terceira pálpebra, no plano nasal hemorragias de 0,1 a 0,3cm e na inserção do chifre direito, sangue coagulado e ausência da camada córnea.

Petéquias, equimoses e sufusões (moderadas) distribuídas aleatoriamente foram visualizadas no tecido subcutâneo, língua, glote e epiglote, fâscias musculares, pleura parietal, diafragma, serosas do baço, rúmen, omaso, vesícula biliar, bexiga e gordura perirrenal.

Na cavidade torácica, havia hemorragia difusa entre os anéis traqueais, e na mucosa do terço inicial petéquias e sufusões (Figura 12A); Nos pulmões observaram-se áreas vermelho-escuras e firmes no lobo cranial, próximo ao brônquio primário (Figura 12B). No coração havia equimoses no endocárdio e epicárdio.

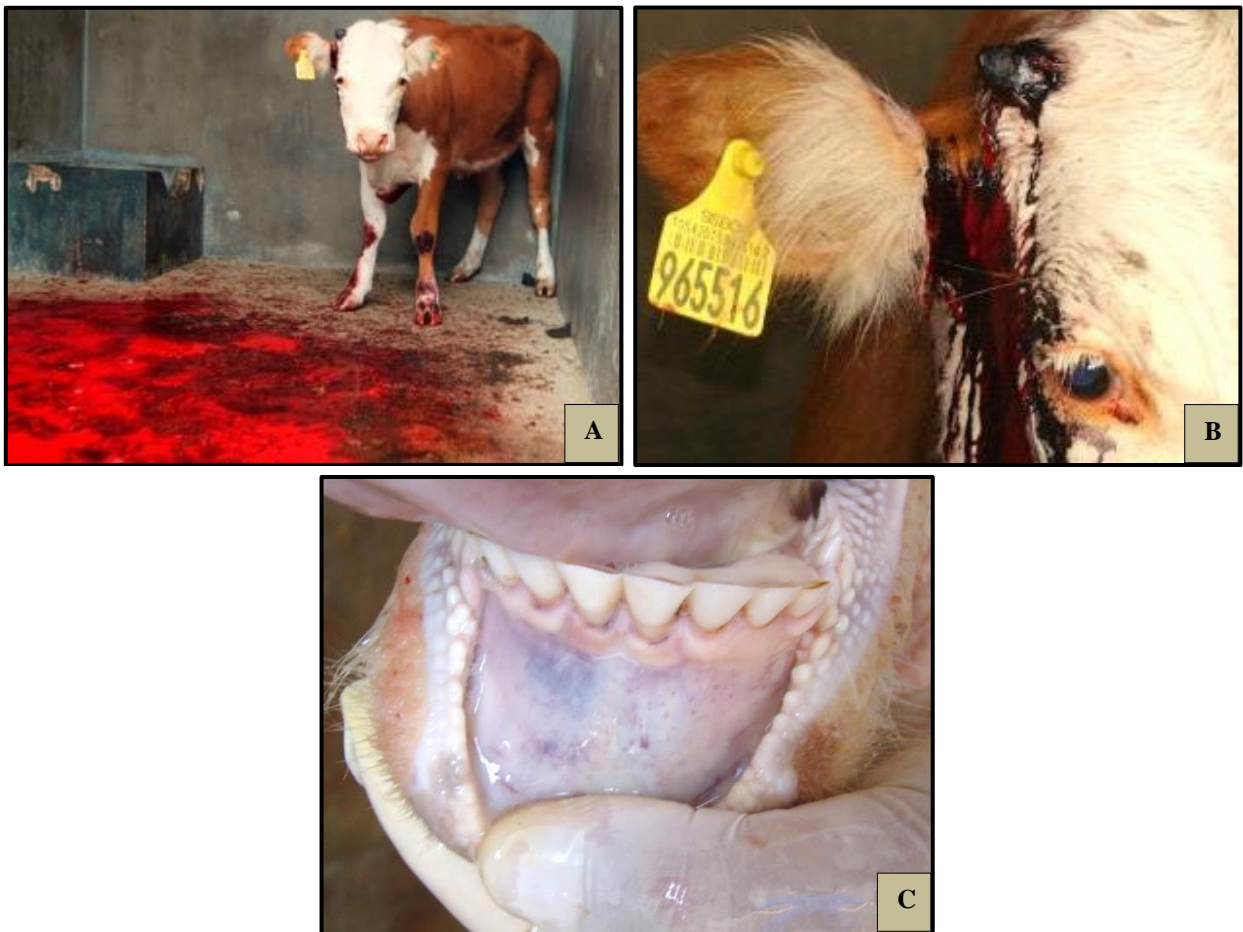


Figura 11. Sinais clínicos do caso de intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* acompanhado. **A.** Hemorragia grave devido à perda da camada córnea do chifre direito. **B.** Chifre direito com ausência da camada córnea e com hemorragia. **C.** Hemorragia na mucosa oral.

Na cavidade abdominal havia aproximadamente 2 litros de líquido avermelhado com leve deposição de fibrina sobre vísceras, omento e parede abdominal. O omento estava avermelhado, o fígado vermelho escuro, o abomaso com a serosa aderida ao omento e com deposição de fibrina nessa área. Ao corte do abomaso foi observado edema acentuado de parede e das pregas, mucosa vermelho escuro, com ulcerações difusas de 0,5 a 3 cm, algumas vezes com deposição de material enegrecido irregular. O odor era fétido e o conteúdo abomasal avermelhado (Figura 12C). O intestino delgado apresentava serosa com áreas esféricas multifocais de 3 a 4 cm avermelhadas, e uma área também esférica de mais ou menos 2 cm de diâmetro branco-amarelado, com deposição de fibrina; ao corte da mucosa havia depressão e deposição de material acinzentado. No intestino grosso, o cólon apresentava a serosa com áreas esféricas de 3 a 6cm de diâmetro, branco-amarelada, opaca, com deposição de fibrina e aderência ao omento; ao corte da mucosa havia ulcerações de bordos irregulares vermelho-escuros, ou cinza-enegrecidos (Figura 12D). Linfonodos mesentéricos, mamários, poplíteos e inguinais eram aumentados de volume, ao corte brilhantes (Figura 12E). A bexiga apresentava mucosa com múltiplas hemorragias de 0,1 a 1cm. O útero continha as carúnculas vermelho escuras

(hemorragia) e o canal vaginal e a cérvix com palidez acentuada e petéquias múltiplas por toda a mucosa (Figura 12F).

À histologia, as lesões hemorrágicas foram confirmadas, na traqueia havia hemorragia de submucosa, no coração hemorragia moderada no endocárdio, na bexiga, hemorragia na mucosa abaixo do epitélio e da lâmina própria e no útero acentuada hemorragia da mucosa e submucosa, com alguns bastonetes na submucosa. No linfonodo mesentérico havia edema, bolhas de gás na região cortical e medular e necrose de centros germinativos, com múltiplos agregados bacterianos (Figura 13A e B). No intestino foi verificado edema acentuado da submucosa e da camada muscular, com fibrina e bastonetes multifocais, associado a congestão de vasos. No abomaso havia hemorragia extensa da submucosa, associado a edema e fibrina; na mucosa via-se necrose difusa. Na medula óssea havia rarefação e ausência do tecido hematopoético.

Foram coletadas amostras para isolamento bacteriano.

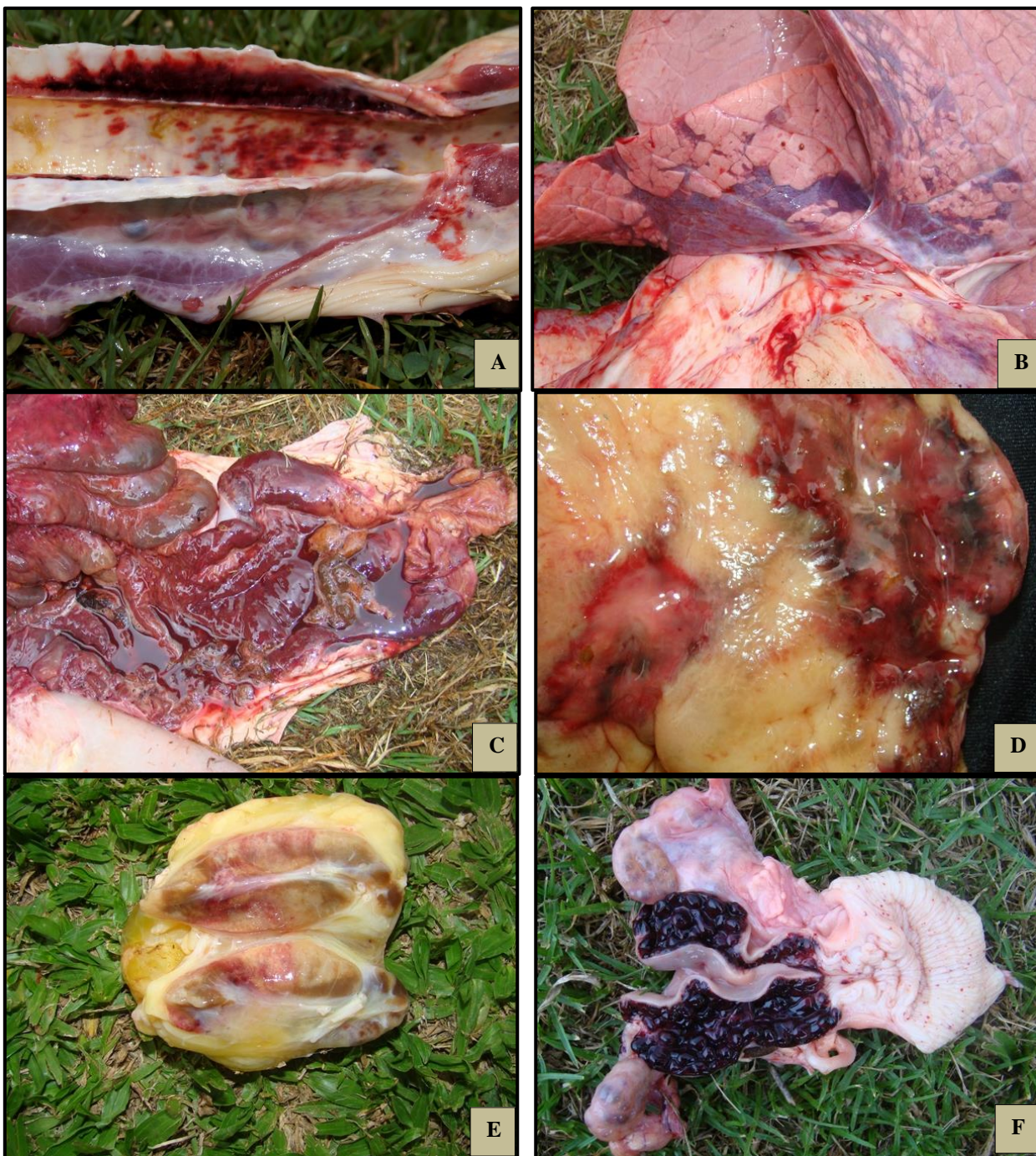


Figura 12. Lesões macroscópicas observadas à necropsia do bovino acompanhado clinicamente na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Traqueia com hemorragia na mucosa e tecidos adjacentes. **B.** Pulmão com áreas vermelho escuras e firmes no lobo cranial próximo ao brônquio primário. **C.** Abomaso com edema acentuado das pregas, mucosa e conteúdo avermelhados. **D.** Mucosa do cólon com ulcerações de bordos irregulares vermelho escuros com áreas enegrecidos. **E.** Linfonodos mesentéricos aumentados de volume, brilhantes com áreas avermelhadas e amareladas. **F.** Mucosa uterina com mucosa difusamente hemorrágica; mucosa da vagina e da cérvix com acentuada palidez e petéquias.

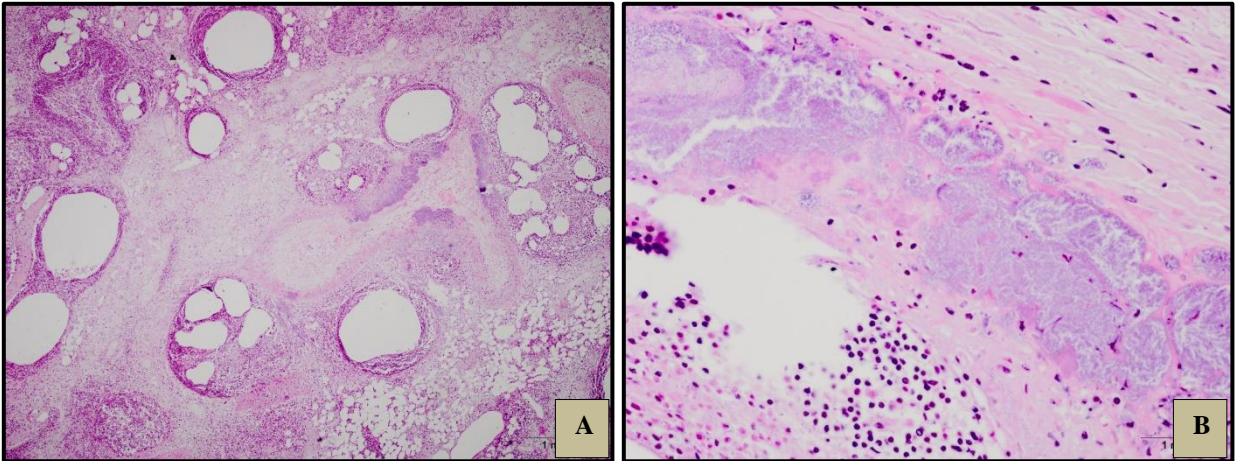


Figura 13. Lesões histológicas de linfonodo mesentérico do bovino acompanhado clinicamente na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Linfonodo mesentérico com edema, bolhas de gás na região cortical e medular com necrose de centros germinativos (HE, obj. 4). **B.** Evidenciação de bastonetes basófilos próximos à cápsula (HE, obj. 40).

4.2.2 Necropsias realizadas

Foram realizadas 670 necropsias em bovinos no período de janeiro de 2011 a junho de 2014; destas 27 necropsias foram de casos de intoxicação por *Pteridium arachnoideum*, 11 foram de carcinomas de trato digestório superior, sete de hematúria enzoótica e nove de intoxicação aguda.

Na intoxicação aguda, 6 casos (67%) ocorreram no outono, e 3 casos (33%) no verão.

Em todas as propriedades visitadas foi verificado o consumo de *Pteridium arachnoideum* (Figura 14A). O consumo por parte dos animais não ocorria somente em propriedades em que a oferta de pastagem era deficiente, mas também quando havia pastagem em boa quantidade e qualidade. A disponibilidade da samambaia era variável, algumas propriedades possuíam grande quantidade de brotação em meio às pastagens (Figura 14B) e outras apenas em beiradas de cerca, e nestes locais também havia sinais de consumo.

Nos casos de intoxicação aguda os históricos foram semelhantes: animais com febre alta, acima de 40°C e fezes ou diarreia com sangue (melena) (Figura 16A). No início dos sinais clínicos a suspeita primária era de tristeza parasitária.



Figura 14. A. Brotação de *Pteridium arachnoideum* consumida. B. Piquete com grande infestação de *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*, Coxilha Rica, Lages, SC.

As lesões macroscópicas caracterizaram-se por palidez das mucosas, hemorragias, de diferentes graus de extensão e gravidade desde mucosas a tecido subcutâneo (Figura 15A), fâscias musculares, serosas de vísceras e cavidades. Havia hemorragia entre a dura-máter e pia-máter (Figura 15B).

Infartos foram observados no pulmão, representados por áreas vermelho escuras, visível na pleura e se estendia ao parênquima (Figura 15C). No fígado eram representados por áreas pálidas a amareladas, de diferentes tamanhos, distribuição irregular, únicos ou múltiplos, visíveis na capsula e no parênquima, de diferentes tamanhos (Figura 15D).

No intestino verificou-se serosa com áreas esféricas multifocais avermelhada, ou branco-amareladas, opacas e com deposição de fibrina; ao corte a mucosa apresentava depressão e deposição de material acinzentado. Na luz intestinal, coágulos de sangue de diferentes tamanhos e fezes com sangue (Figuras 15E e F). O abomaso apresentava mucosa vermelho escura, com edema de parede e/ ou com múltiplas ulcerações.

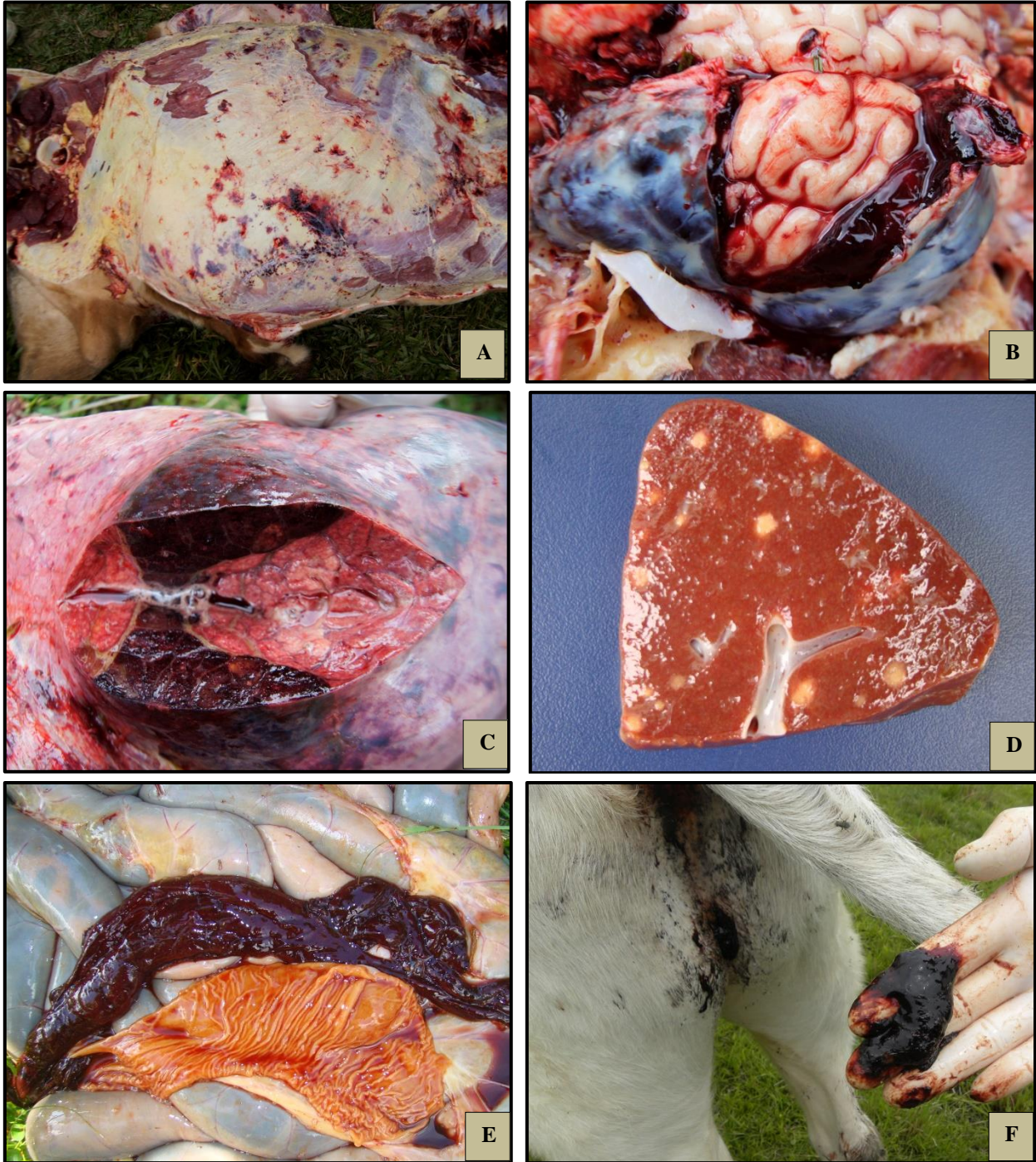


Figura 15. Lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Hemorragia no tecido subcutâneo **B.** Hemorragia entre a pia-máter e a dura-máter. **C.** Fígado com múltiplos infartos amarelados medindo 0,5cm. **D.** Pulmão com infarto vermelho escuro em vários lóbulos. **E.** Coágulo sanguíneo na luz intestinal. **F.** Fezes vermelho escuras e amolecidas.

À histologia verificaram-se hemorragias; no pulmão, edema com fibrinas nos septos interlobulares, lóbulos com necrose e hemorragias multifocais a difusas, muitas vezes associadas a agregados de bastonetes basófilos (Figuras 16A e B). No abomaso havia hemorragia extensa na submucosa, associada a edema e fibrina; na mucosa, às vezes, via-se necrose difusa. Os linfonodos tinham edema e necrose dos centros germinativos, com ou sem agregados bacterianos.

No fígado foram visualizadas necrose de coagulação centrolobular, hepatócitos da região mediozonal com degeneração vacuolar quando não havia infarto (Figuras 16A e B), e necrose de coagulação focal, multifocal ou massiva, com agregados bacterianos em fígados em que havia infartos, algumas vezes associadas a estas lesões haviam bolhas de gás (Figuras 16C e D).

No intestino havia hemorragia na mucosa (Figura 17C), edema e deposição de fibrina na serosa, edema nas camadas submucosa e muscular, com congestão de vasos da submucosa (Figura 17D). Associado ao edema, foram observados bastonetes Gram positivos difusos (Figura 17E). Na medula óssea havia rarefação ou ausência de tecido mieloide (Figura 17F).

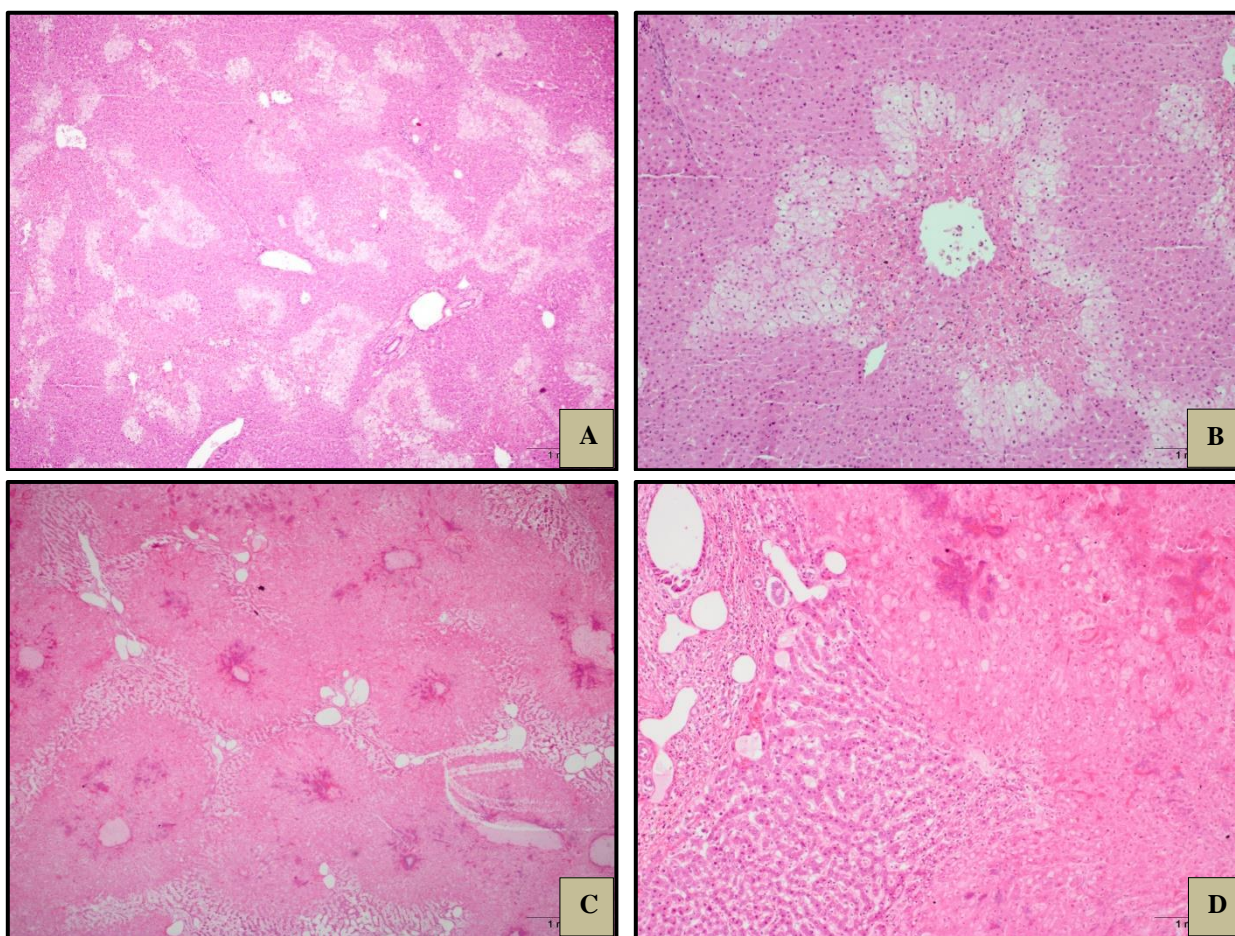


Figura 16. Lesões histológicas de fígado de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em necropsias realizadas entre 2011 a 2014. **A.** Necrose centrolobular, com agregados bacterianos e bolhas de gás. (HE, obj. 4). **B.** Detalhe de A. (HE, obj. 10). **C.** Evidenciação de bastonetes basófilos. (HE, obj. 40). **D.** Hepatócitos na região mediozonal com degeneração vacuolar. (HE, obj. 4). **E.** Detalhe de D (HE, obj. 10). **F.** Detalhe de D. (HE, obj. 40).

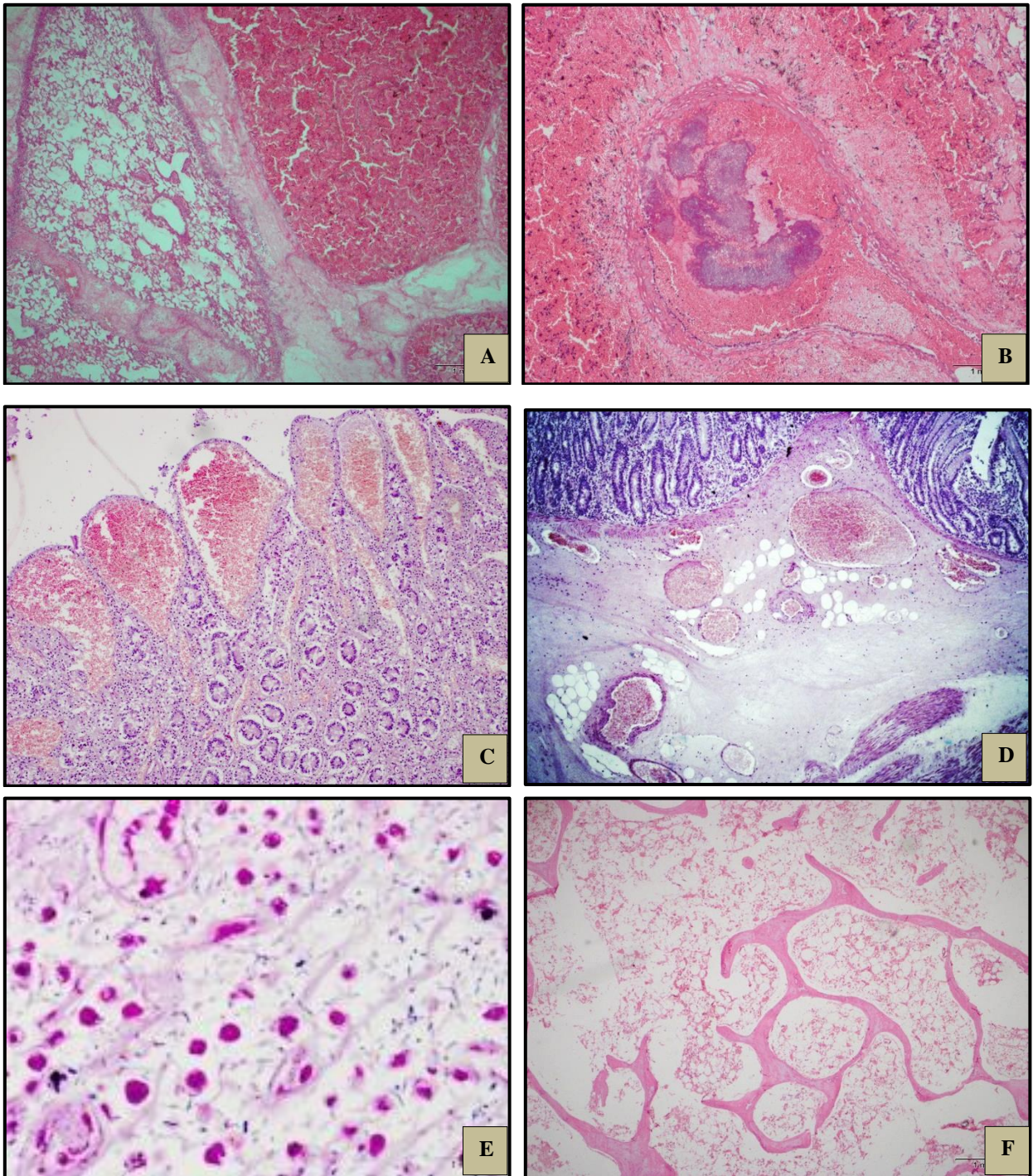


Figura 17. Lesões histológicas de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em necropsias realizadas entre 2011-2014. **A.** Pulmão com edema dos septos pulmonares e lobo com extensa hemorragia. (HE, obj. 4). **B.** Agregados bacterianos basófilos no interior de vaso no pulmão em área de infarto (HE, obj. 10). **C.** Hemorragia na mucosa do intestino delgado (HE, obj. 10). **D.** Congestão de vasos e edema da submucosa de intestino grosso (HE, obj. 4). **E.** Evidenciação de bastonetes Gram positivos no edema de submucosa do intestino grosso (Gram, obj. 40). **F.** Medula óssea com ausência de tecido hematopoético (HE, obj. 10).

4.3 Reprodução Experimental

Os resultados da reprodução experimental constam na Tabela 5.

Os **sinais clínicos** se iniciaram em cinco a seis dias antes da morte, somente o Bovino 3 morreu em 20 horas após o início dos sinais, sem apresentar elevação na temperatura. Os outros três apresentaram aumento da temperatura, que variou entre 39 a 42°C. Os quatro bovinos tiveram alterações no aspecto das fezes (Figuras 18A-F), o Bovino 1 apresentou diarreia líquida esverdeada, com poucos e pequenos coágulos, evacuou grande quantidade de coágulos, antes de morrer (Figuras 18A-C), enquanto os Bovinos 2 e 3, apresentaram as fezes amolecidas, com quantidade moderada de muco e de coágulos de sangue (Figuras 18 D e E), e o Bovino 4 (Figura 18F) apresentou fezes secas e poucos coágulos.

Tabela 5. Reprodução experimental da intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em bovinos

Bovino	Vacina	Dose de planta por kg	Início e fim do experimento	Total de dias em experimento	Total de planta ingerida	% de ingestão em relação ao peso vivo	Desfecho
1	Sim	20g	1.11.13 23.1.14	82	442,76 kg	149,80	Morreu
2	Sim	20g	1.11.13 4.2.14	94	444,83kg	180,6	Morreu
3	Não	14g	3.12.13 19.1.14	46	80,22 kg	71,0	Morreu
4	Não	10g	3.12.13 19.2.14	76	76,64 kg	75,2	Eutanasiada

Todos os bovinos apresentaram desidratação e mucosas pálidas. As hemorragias nas mucosas foram mais acentuadas na mucosa oral do Bovino 2 (Figura 19A) e observou-se hemorragia na câmara anterior do olho do Bovino 4 (hifema) (Figura 19B) e hemorragia nasal no Bovino 4 (Figura 19C)

Verificou-se sangue aquoso e o tempo de coagulação aumentado em todos os bovinos. Aos 45 dias de experimento ao coletar sangue na veia coccígea do Bovino 2, o sangue permaneceu escorrendo por 10 minutos, para então coagular; no dia que morreu, permaneceu sangrando por 30 minutos na veia coccígea após a coleta de sangue. Adicionalmente havia sangramento nos membros em picadas de insetos nos Bovinos 1, 2 e 4 (Figuras 19D e E) e hemorragia na mucosa vulvar (Figuras 19F). Outros detalhes sobre os sinais clínicos contam no Anexo 1.



Figura 18. Aspectos das fezes dos bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Bovino 1: diarreia líquida esverdeada no primeiro dia de evolução clínica. **B.** Bovino 1: Diarreia com poucos e pequenos coágulos de sangue no primeiro dia de evolução clínica. **C.** Bovino 1: coágulos de sangue eliminados 3 horas antes de morrer. **D.** Bovino 2: fezes com coágulos de sangue. **E.** Bovino 3: fezes amolecidas com grande quantidade de muco e poucos coágulos de sangue. **F.** Bovino 4: fezes secas com poucos coágulos de sangue.



Figura 19. Hemorragias observadas em bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Numerosas petéquias e equimoses por toda a mucosa oral (Bovino 2). **B.** Hemorragia na câmara anterior do olho (hifema) (Bovino 4). **C.** Hemorragia nasal (Bovino 4). **D.** Sangramento após picadas de insetos (Bovino 1). **E.** Sangramento após picadas de insetos (Bovino 4). **F.** Hemorragia na mucosa vulvar (Bovino 4).

Os exames hematológicos dos bovinos em experimento constam na Tabela 6.

As alterações nos exames iniciaram com o início dos sinais clínicos. Revelaram diminuição das plaquetas nos Bovinos 1, 2 e 4, hematócritos abaixo dos valores normais em todos os bovinos, eritrócitos dentro da normalidade, leucogramas dentro dos valores de referência nos Bovinos 1,3 e 4, e abaixo dos valores de referência no Bovino 2, todos os bovinos apresentaram neutropenia.

Tabela 6. Exame hematológico de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*

Bovinos	Plaquetas (mil/uL)	Hematócrito (%)	Eritrócitos (milhões /uL)	Neutrófilos segmentados /uL	Neutrófilos Bastonetes /uL	Eosinófilos /uL	Basófilos /uL	Monócitos /uL	Linfócitos /uL
1	96	30	7,03	237,9	0	79,3	79,3	79,3	7454
2	100	13	3,18	20	0	10	10	10	950
3	250	33,1	8,5	130	0	26	26	78	2340
4	104	27	5,2	186	0	54	40	40	2567
Valor de referência	140-400	35-46	3,9-5,4	600-4.000	0-120	0-2.400	0-200	25-840	2.500-7.500

À **necropsia** do Bovino 1, observaram-se mucosas pálidas, hemorragia de terceira pálpebra, desidratação severa e secreção nasal sanguinolenta leve, na cavidade nasal hemorragia focal de 1x3cm na região do septo de ambas as narinas. Na cavidade torácica, no terço médio do esôfago havia hemorragia focal na serosa (10cm) e no coração hemorragia leve focal no epicárdio e acentuada focalmente extensa próximo as cordas tendinosas. Na cavidade abdominal, o abomaso apresentava a mucosa avermelhada com múltiplas úlceras de 0,2-1cm de diâmetro com coágulos de sangue aderidos. No intestino, a serosa apresentava hemorragias multifocais, ao corte mucosa com áreas de erosão e de superfície irregular. O cólon espiral apresentava a mucosa vermelho enegrecida contendo coágulo de sangue por toda a extensão (Figuras 20A e B); ceco com áreas multifocais avermelhadas. Na bexiga havia petéquias na mucosa.

O Bovino 2 apresentou hemorragia na terceira pálpebra e mucosa oral e região ventral da língua com petéquias. No tecido subcutâneo havia equimoses e sufusões. No coração havia hemorragias no epicárdio, de grau moderado, e equimoses próximo as artérias aorta e pulmonar (Figura 20C).

Na cavidade abdominal, verificou-se hemorragias no diafragma (Figura 20D) e hemorragias difusas na serosa do baço. Na face diafragmática do fígado havia áreas irregulares esbranquiçadas visíveis na cápsula e no parênquima, medindo de 2-3cm por 0,5 cm (Figura 20 E), na vesícula biliar havia hemorragia e edema de parede. O abomaso apresentava a serosa avermelhada, a parede espessa e com múltiplas úlceras (Figura 20F), e no intestino havia áreas de hemorragia na serosa e áreas brancas a amareladas, às vezes de bordos avermelhados; ao corte a mucosa com áreas de erosões e o conteúdo intestinal com coágulos. Na bexiga havia hemorragias na mucosa. As articulações fêmoro-tíbio-patelares apresentavam o líquido sinovial avermelhado.

No Bovino 3, as mucosas eram pálidas e a desidratação severa; quase não se observaram hemorragias no tecido subcutâneo. Na cavidade torácica, verificou-se pequenas hemorragias no epicárdio, e no pulmão áreas vermelho-escuras de aproximadamente 2cm (infartos) e os linfonodos tráqueo-brônquicos aumentados de volume. Na cavidade abdominal, havia aproximadamente um litro de líquido seroso avermelhado; o omento apresentava os vasos evidentes e equimoses multifocais (Figura 21A), com moderada quantidade de fibrina sobre as vísceras. No pâncreas havia hemorragia focal de 10cm. O fígado apresentava uma área amarelada de aproximadamente 7cm, e outras menores de 0,2-1cm multifocais, de bordos irregulares (infartos) (Figura 21B). No intestino, havia áreas de 2-6 cm, amarelo-esbranquiçadas, com aderências de alças intestinais, omento e parede abdominal (Figura 21C). O conteúdo era líquido e avermelhado, com coágulos de sangue por toda a luz. Na bexiga verificou-se petéquias na mucosa e na musculatura esquelética dos membros posteriores havia hemorragias multifocais de 2cm.

O Bovino 4 apresentou desidratação severa com mucosas ocular, oral e vulvar pálidas. Havia crostas e erosões na pele dos membros. As narinas estavam com ulcerações multifocais no septo nasal. No tecido subcutâneo havia hemorragias na periferia dos vasos dos membros (Figura 21D). Na cavidade torácica, os pulmões possuíam lóbulos multifocais de coloração vermelho-escuro e no coração havia equimoses e sufusões no epicárdio.

Na cavidade abdominal verificou-se o omento com petéquias multifocais. No fígado haviam múltiplos pontos (1-2mm) amarelados multifocais, distribuídos na cápsula e no parênquima (Figura 21E). Na vesícula biliar foram observadas petéquias e equimoses na serosa. O intestino apresentava edema de mesentério, hemorragias focais na serosa e petéquias na mucosa. O conteúdo era líquido em toda a extensão intestinal e os linfonodos mesentéricos eram edemaciados. No abomaso havia edema de parede e a mucosa com múltiplas ulcerações (Figura 21F), e no tecido subcutâneo da parte distal dos membros haviam hemorragias ao longo dos vasos.



Figura 20. Lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Serosa do cólon espiral vermelho escura (Bovino 1). **B.** superfície de corte do cólon espiral com grande coágulo de sangue na luz (Bovino 1). **C.** Hemorragias multifocais na aorta e artéria pulmonar (Bovino 2). **D.** Hemorragia no diafragma e rúmen ao longo dos vasos (Bovino 2). **E.** Infarto visível no parênquima do fígado **F.** Abomaso com mucosa avermelhada e hemorragia na parede.

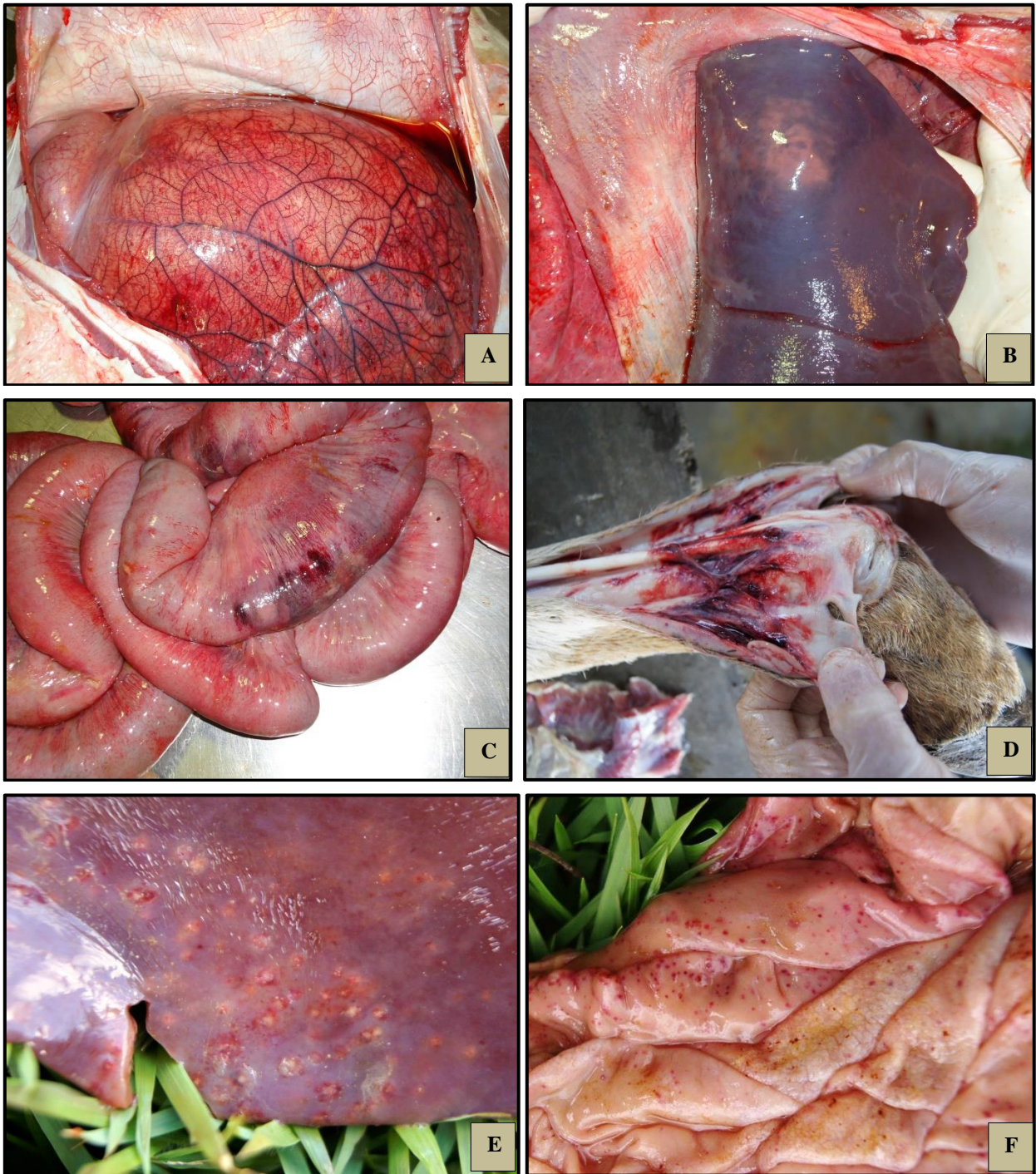


Figura 21. Lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **C.** Omento avermelhado com evidência dos vasos (Bovino 3). **D.** Fígado com área de infarto na face diafragmática (Bovino 3). **E.** Serosa intestinal com áreas amareladas e áreas hemorrágica (Bovino 3). **F.** Corte de intestino com conteúdo intestinal com coágulos (Bovino 3). **A.** Serosa da vesícula biliar com hemorragia. **B.** Hemorragia no tecido subcutâneo de membro pélvico. **C.** Abomaso com edema leve e petéquias na mucosa. **D.** Detalhe de C. **E.** Fígado com superfície capsular com pequenos e múltiplos infartos **F.** superfície de corte de E.

À **histologia**, verificou-se que não havia reação inflamatória associada às lesões e quando presente, era discreta. As lesões histológicas constam na Tabela 7.

Tabela 7. Descrição das lesões histológicas de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*

Órgão	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4
Pulmão	Ausência de lesões	Hemorragia e edema leve interlobular multifocal	Necrose, deposição de fibrina e hemorragia associados a restos celulares. Poucos bastonetes basófilos intralesionais (Figuras 223A e B)	Hemorragias multifocais, associada a agregados bacterianos
Coração	Acentuada hemorragia subepicárdica e entre fibras de Purkinje	Hemorragia moderada difusa no endocárdio e epicárdio	Hemorragia leve no endocárdio e epicárdio	Hemorragia leve de epicárdio
Fígado	Necrose de coagulação centrolobular (Figura 23A)	Necrose de coagulação multifocal a difusa, com agregados bacterianos intralesionais e na luz de vasos (Figura 22B), hemorragia centrolobular, e hepatócitos da periferia com degeneração vacuolar	Necrose de coagulação multifocal a difusa, com agregados bacterianos intralesionais (Figura 22C e D) e bolhas de gás.	Necrose de coagulação multifocal a difusa, com agregados bacterianos intralesionais associado a focos de hepatócitos necróticos (Figura 22E e F)
Baço	Ausência de lesões	Hemorragia supcapsular	Ausência de lesões	Ausência de lesões
Rúmen	Ausência de lesões	Necrose de epitélio da papila estendendo-se até a submucosa, associado a edema, fibrina e agregados bacterianos (Figuras 24C e D)	Ausência de lesões	Ausência de lesões
Retículo	Ausência de lesões	Ausência de lesões	Ausência de lesões	Ausência de lesões
Abomaso	Necrose multifocal na mucosa, e às vezes até submucosa (úlceras)	Hemorragia e necrose acentuada na mucosa, com edema acentuado de submucosa, associada a congestão e bastonetes basófilos.	Hemorragia e necrose acentuada na mucosa, com edema acentuado de submucosa, associada a congestão e bastonetes basófilos	Edema de submucosa e hemorragias multifocais na mucosa

“Tabela 7. Continuação”

Intestino delgado	Edema acentuado de submucosa e serosa. Serosa com proliferação de colágeno. Hemorragia, necrose e deposição de fibrina na superfície da mucosa. Necrose de placa de Peyer focal (Figura 24E e F)	Hemorragia multifocal moderada na mucosa, edema acentuado de submucosa, associada a congestão. Íleo: necrose multifocal com hemorragia edema e deposição de fibrina na submucosa, infiltrado inflamatório mononuclear leve, associado a bastonetes basófilos.	Edema acentuado de submucosa e serosa com proliferação de colágeno. Hemorragia e deposição de fibrina na superfície da mucosa. Com deposição de fibrina ao redor de vasos. Algumas vezes havia necrose de placas de Peyer	Edema leve de serosa e moderado de submucosa
Bexiga	Ausência de lesões	Hemorragia multifocal moderada na lâmina própria	Ausência de lesões	Hemorragia multifocal moderada na lâmina própria
SNC	Ausência de lesões	Ausência de lesões	Ausência de lesões	Ausência de lesões
Linfonodo	Edema na região medular, com leve infiltrado de macrófagos leve e hemorragia subcapsular	Hemorragia acentuada subcapsular	Folículos linfoides com necrose associada a edema e congestão medular	Edema e hemorragia moderada no córtex e medula
Rim	Ausência de lesões	Cilindros hialinos na luz de túbulos	Ausência de lesões	Cilindros hialinos na luz de túbulos
Músculo esquelético	Ausência de lesões	Ausência de lesões	Necrose focal de fibras musculares, associada a eosinofilia de fibras, edema e bastonetes basófilos entre as miofibras (Figuras 24A e B)	Ausência de lesões
Medula óssea	Rarefação e ausência de tecido hematopoético (Figura 23C)	Rarefação e ausência de tecido hematopoético (Figura 23D)	Ausência de tecido hematopoético e hemorragia leve (Figura 23E)	Ausência de tecido hematopoético (Figura 23F)

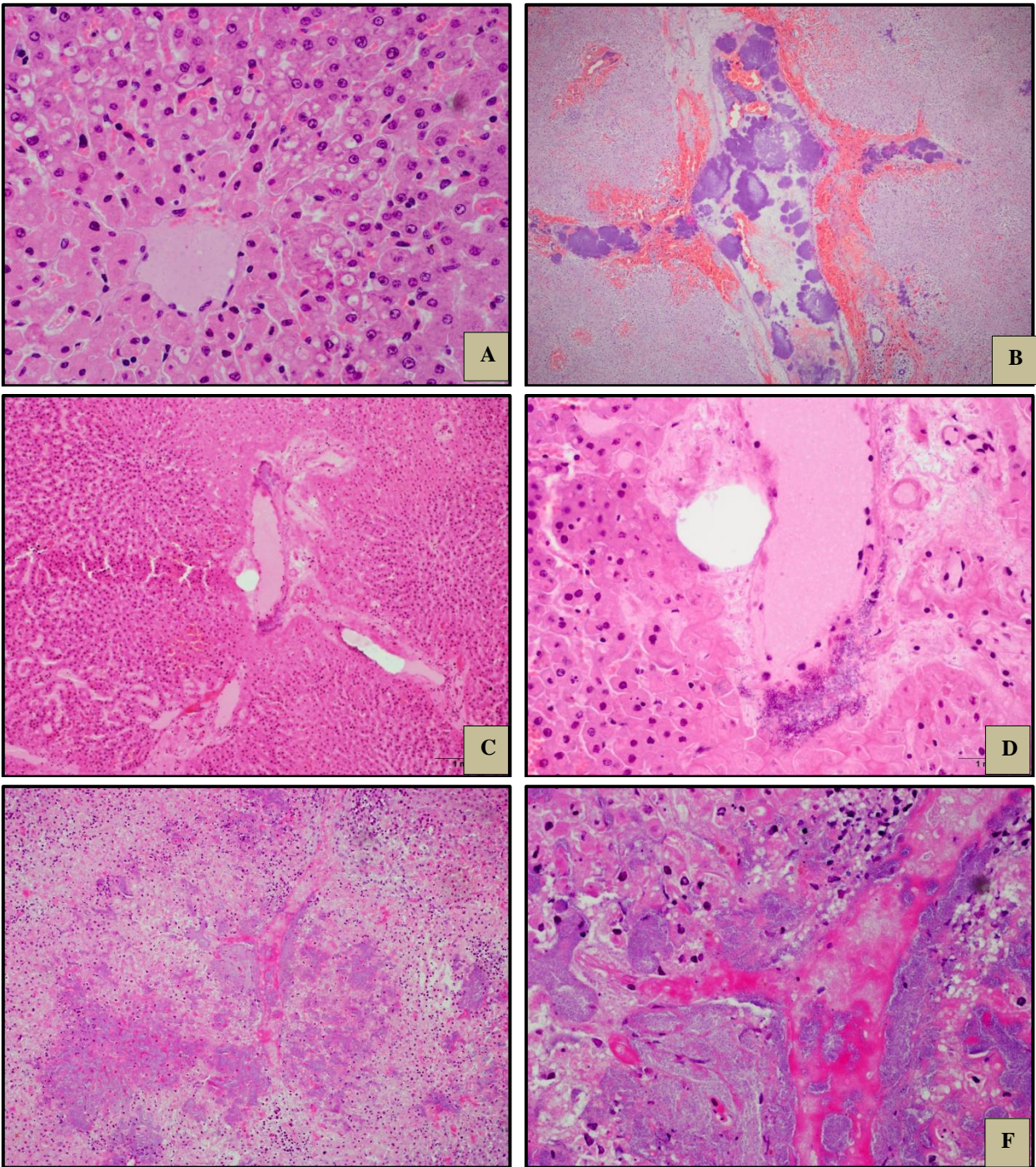


Figura 22. Lesões histológicas de fígado de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium arachnoideum*. **A.** Necrose de coagulação centrolobular com hepatócitos na periferia com degeneração vacuolar (Bovino1) (HE, obj. 40). **B.** Hemorragia perivascular e agregados bacterianos basófilos no interior de vasos e entre hepatócitos (Bovino 2) (HE, obj. 10). **C.** Necrose de coagulação e agregados bacterianos basófilos (Bovino 3) (HE, obj. 4). **D.** Detalhe de C, agregados bacterianos na periferia e no interior de vasos (Bovino 3) (HE, obj. 40). **E.** Necrose de coagulação e agregados bacterianos basófilos entre hepatócitos e no interior de vasos (Bovino 4) (HE, obj. 4). **F.** Detalhe de E, evidência de agregados de bastonetes basófilos no interior de vasos e em meio a necrose (Bovino 4) (HE, obj. 40).

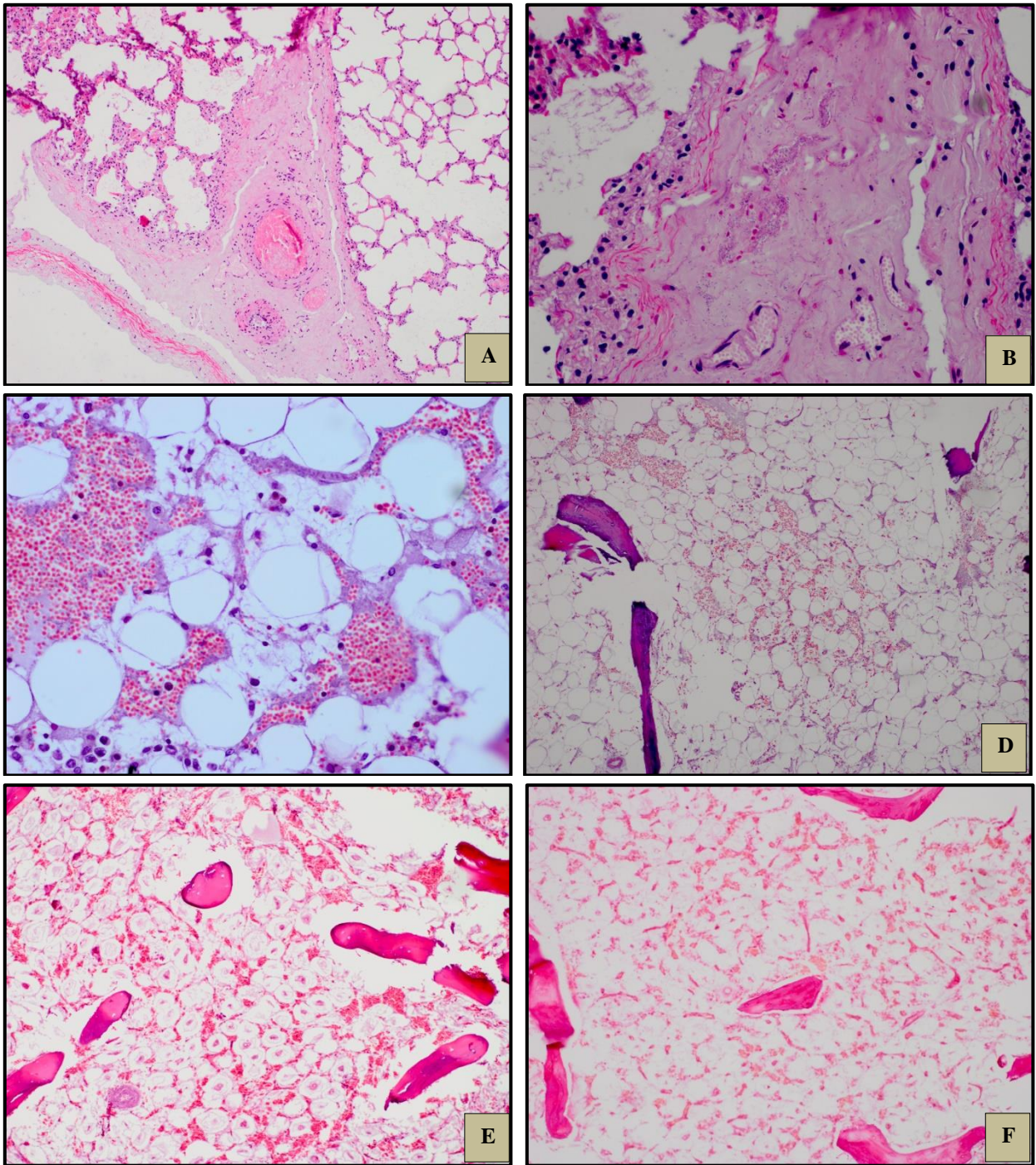


Figura 23. Lesões histológicas de pulmão e medula óssea de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium arachnoideum*. **A.** Pulmão com edema de septo interlobular e congestão de vasos (Bovino 3) (HE, obj. 4). **B.** Detalhe de A, evidência de bastonetes basófilos (setas) (Bovino 3) (HE, obj. 40). Extensa hemorragia no epicárdio. (HE, obj. 4). **C.** Medula óssea com ausência de tecido hematopoético e hemorragia (Bovino1) (HE, obj. 10). **D.** Medula óssea com ausência de tecido hematopoético (Bovino 2) (HE, obj. 10). **E.** Medula óssea com ausência de tecido hematopoético e hemorragia leve (Bovino3) (HE, obj, 10). **F.** Medula óssea com ausência de tecido hematopoético (Bovino4) (HE, obj, 10).

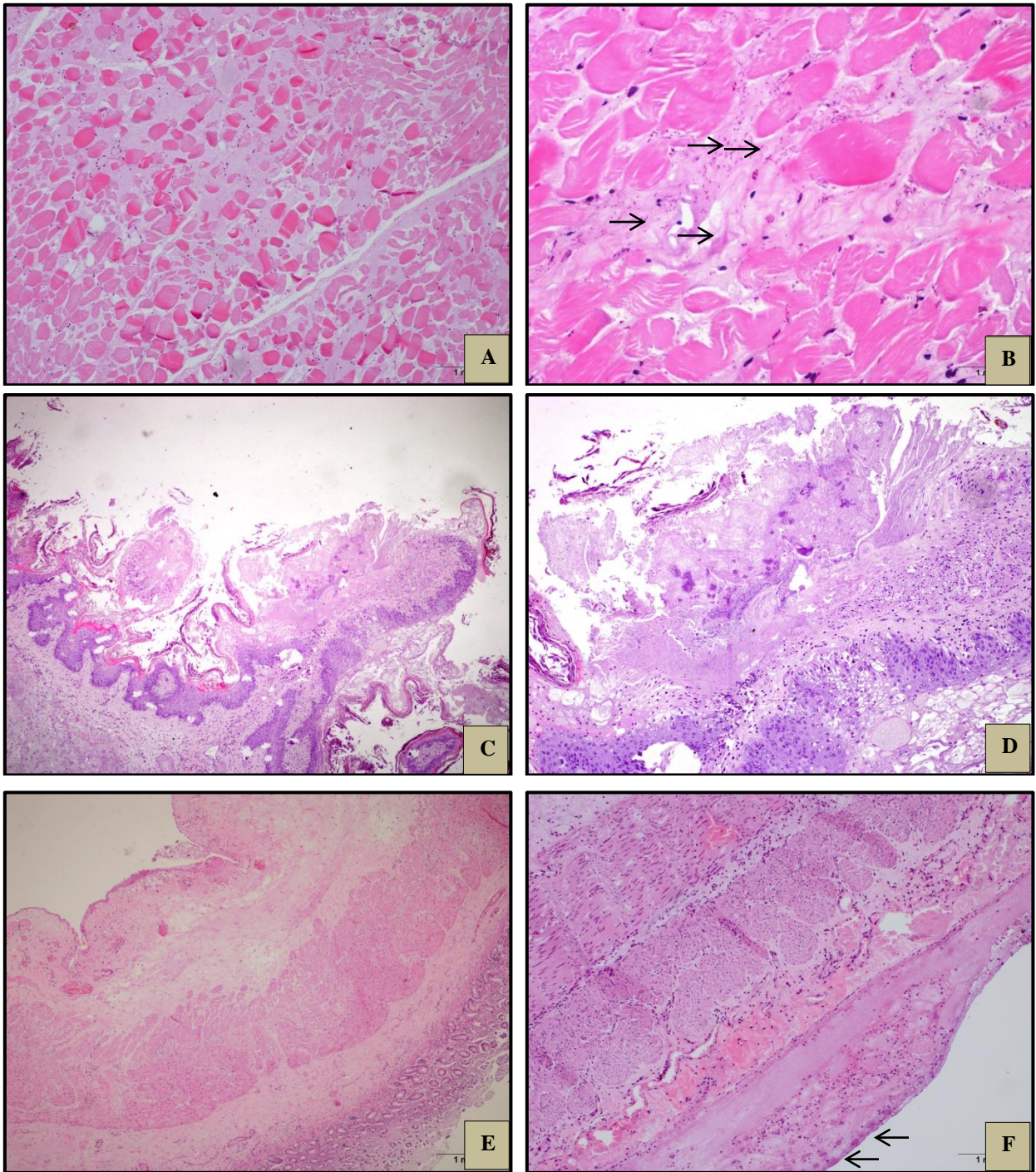


Figura 24. Lesões histológicas de musculatura esquelética, rúmen e intestino de bovinos na intoxicação aguda experimental por *Pteridium arachnoideum*. **A.** Músculo esquelético com necrose, eosinofilia de fibras e edema entre as miofibras (Bovino 3) (HE, obj. 4). **B.** Detalhe de A, evidenciação do edema entre as miofibras e bastonetes basófilos multifocais (seta) (Bovino 3) (HE, obj. 40). **C.** Rúmen com ulceração na mucosa (Bovino 2) (HE, obj.4). **D.** Detalhe de C, evidenciação de agregados bacterianos (setas) (Bovino 2) (HE, obj. 10). **E.** Intestino delgado com edema de submucosa e proliferação de colágeno da serosa (Bovino 3) (HE, obj. 4). **F.** Detalhe de E, evidenciação de hemorragia, edema e agregados bacterianos basófilos (seta) (Bovino 3) (HE, obj. 10).

4.4 Isolamento e Identificação Bacteriana

4.4.1 Isolamento bacteriano

Os resultados do isolamento bacteriológico constam na Tabela 8.

Tabela 8. Isolamento bacteriano e inoculação em camundongos realizados no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, UNESP - Campus de Araçatuba, São Paulo

Camundongo	Número de registro (SAP)	Tipo de amostra	Meio de Tarozzi Formação de gás após 24 horas ^a	Desfecho	<i>Imprint</i> de cápsula de fígado de camundongo ^c
1	34625	Fígado	+	Eutanasiado	-
2	35464	Fígado	-	Eutanasiado	-
3	35467	Fígado	-	Eutanasiado	-
4	35484	Intestino (I)	+++	Eutanasiado	-
5	35484	Intestino (II)	++	Eutanasiado	-
6	35484	Intestino (III)	++	Eutanasiado	-
7	35526	Intestino (I)	++	Adoceu Eutanasiado	-
8	35526	Intestino (II)	++	Eutanasiado	-
9	35926	Fígado (I)	+++	Eutanasiado	-
10	35926	Fígado (II)	++	Eutanasiado	-
12	35926	Intestino	++	Eutanasiado	-
13	37692	Pulmão	-	Eutanasiado	-
14	37320	Intestino	-	Eutanasiado	-
15	38667	Fígado	-	Eutanasiado	-
16	38667	Linfonodo	+++	Eutanasiado	-
17	38667	Intestino (I)	+++	Eutanasiado	+
18	38667	Intestino (II)	++	Eutanasiado	-
19	38667	Língua (I)	-	Eutanasiado	-

^a sem produção de gás (-); pouco gás (+); Moderado gás (++); Muito gás (+++)

^c ausência de bastonetes Gram positivos (-); poucos bastonetes Gram positivos (+); moderada quantidade de bastonetes Gram positivos (++); grande quantidade de bastonetes Gram positivos (+++)

“Tabela 8. Continuação”

20	38667	Língua (II)	+	Eutanasiado	-
21	38667	Abomaso	+++	Eutanasiado	+
22	38792	Fígado	++	Eutanasiado	-
23	38792	Pulmão	+	Morreu após 6:50h	+++
24	38792	Pulmão	+	Eutanasiado	+
25	39044	Intestino	+++	Eutanasiado	-
26	39044	Abomaso (I)	+++	Eutanasiado	-
27	39044	Abomaso (II)	+++	Eutanasiado	-
28	39044	Abomaso (III)	++	Eutanasiado	-
29	40284 ^b	Fígado	++	Morreu após 8h	+++
30	40284 ^b	Pulmão	++	Sacrificado	++
31	40284b	Linfonodo	++	Morreu após 8h	+++
32	40284 ^b	Intestino	++	Sacrificado	+
33	40332 ^b	Fígado	-	-	-
34	40332 ^b	Pulmão	++	Morreu após 12,35h	+++
35	40332 ^b	Linfonodo	++	Adoeceu Eutanasiado	++
36	40332 ^b	Intestino	-	-	-
37	40387 ^b	Fígado	++	Eutanasiado	++
38	40387 ^b	Pulmão	++	Adoeceu Eutanasiado	+
39	40387 ^b	Abomaso	++	Eutanasiado	++
40	40293 ^b	Intestino (I)	++	Adoeceu. Eutanasiado	+
41	40293 ^b	Intestino (II)	++	Adoeceu. Eutanasiado	-
42	40752	Fígado	++	Eutanasiado	-
43	40752	Intestino	++	Eutanasiado	+
44	40385	Fígado	++	Morreu após 8h	+++

^a sem produção de gás (-); pouco gás (+); Moderado gás (++); Muito gás (+++)

^b bovinos com intoxicação aguda experimental por *P. arachnoideum*

^c ausência de bastonetes Gram positivos (-); poucos bastonetes Gram positivos (+); moderada quantidade de bastonetes Gram positivos (++); grande quantidade de bastonetes Gram positivos (+++)

Após as 24 horas de incubação no meio de cultivo de Tarozzi, houveram amostras que não produziram gás (Figura 25A) e as que produziram gás. Dentre estas amostras, haviam as que produziram pouco, moderado e muito gás (Figura 25B). Foram as amostras que tiveram produção de gás que foram utilizadas para a inoculação em camundongo.

Os camundongos doentes apresentavam lentidão, se afastavam do grupo e a respiração se tornava abdominal.

Na necropsia dos camundongos que morreram (Camundongos 23, 29, 31, 34 e 44), as lesões encontradas foram as mesmas: carcaças com cheiro pútrido, o tecido subcutâneo e omento avermelhado (Figura 25C) e com edema, e havia líquido avermelhado na cavidade abdominal. Dois camundongos que foram eutanasiados apresentaram reação inflamatória no local da aplicação (Camundongos 32 e 38), caracterizadas por áreas de aderência da pele com o tecido subcutâneo e presença de pus (abscessos), e quatro que foram eutanasiados apresentaram cheiro pútrido na hora da realização da necropsia (Camundongos 7, 35, 40 e 41).

Nas impressões de fígados coradas com Gram, foram observados bastonetes Gram positivos (Figura 25E e F).

À histologia dos camundongos que morreram naturalmente, verificaram-se na musculatura esquelética da região da coxa, edema entre as fibras com necrose e eosinofilia de fibras e grande quantidade de bastonetes basófilos, associado a infiltrado inflamatório mononuclear leve e hemorragia (Figuras 26A e B).

Na pele verificou-se também infiltrado inflamatório, com edema na derme e grande quantidade de bastonetes basófilos (Figura 26C e D). Nos demais órgãos não foram observadas alterações.

Em ágar sangue foram cultivados os meios de Tarozzi e os fígados dos camundongos que morreram (23, 29, 31, 34 e 44) nestes houveram crescimento intenso de colônias bacterianas hemolíticas (Figura 26D) e não hemolíticas.

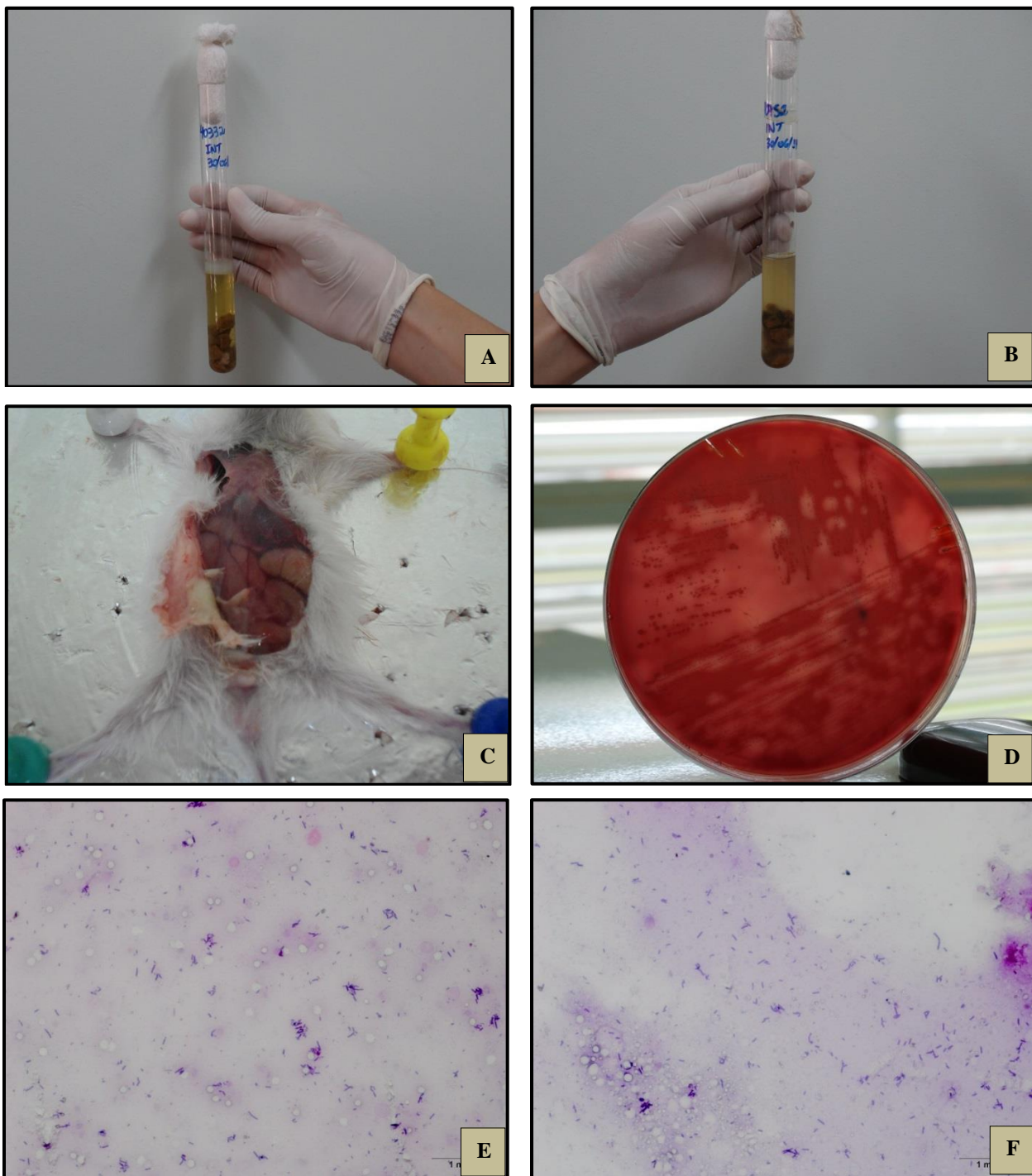


Figura 25. Meio de cultivo de Tarozzi, necropsia de camundongo, cultivo em ágar sangue e impressão da cápsula de fígado de camundongo com inoculação de meio de Tarozzi cultivado com amostras de infartos colhidos de órgãos de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Cultivo em Tarozzi sem produção de gás (seta). **B.** Cultivo em Tarozzi com produção de muito gás (seta). **C.** Cavidade abdominal avermelhada do Camundongo 35. **D.** Cultivo em ágar sangue. Crescimento de bactérias hemolíticas com hemólise do meio. **E.** Impressão da cápsula de fígado de camundongos com evidência de bastonetes Gram positivos (amostra de infarto de fígado do bovino 3) (Gram, obj.100). **F.** Impressão da cápsula de fígado de camundongos com evidência de bastonetes Gram positivos (amostra de infarto de pulmão do bovino 2) (Gram, obj.100).

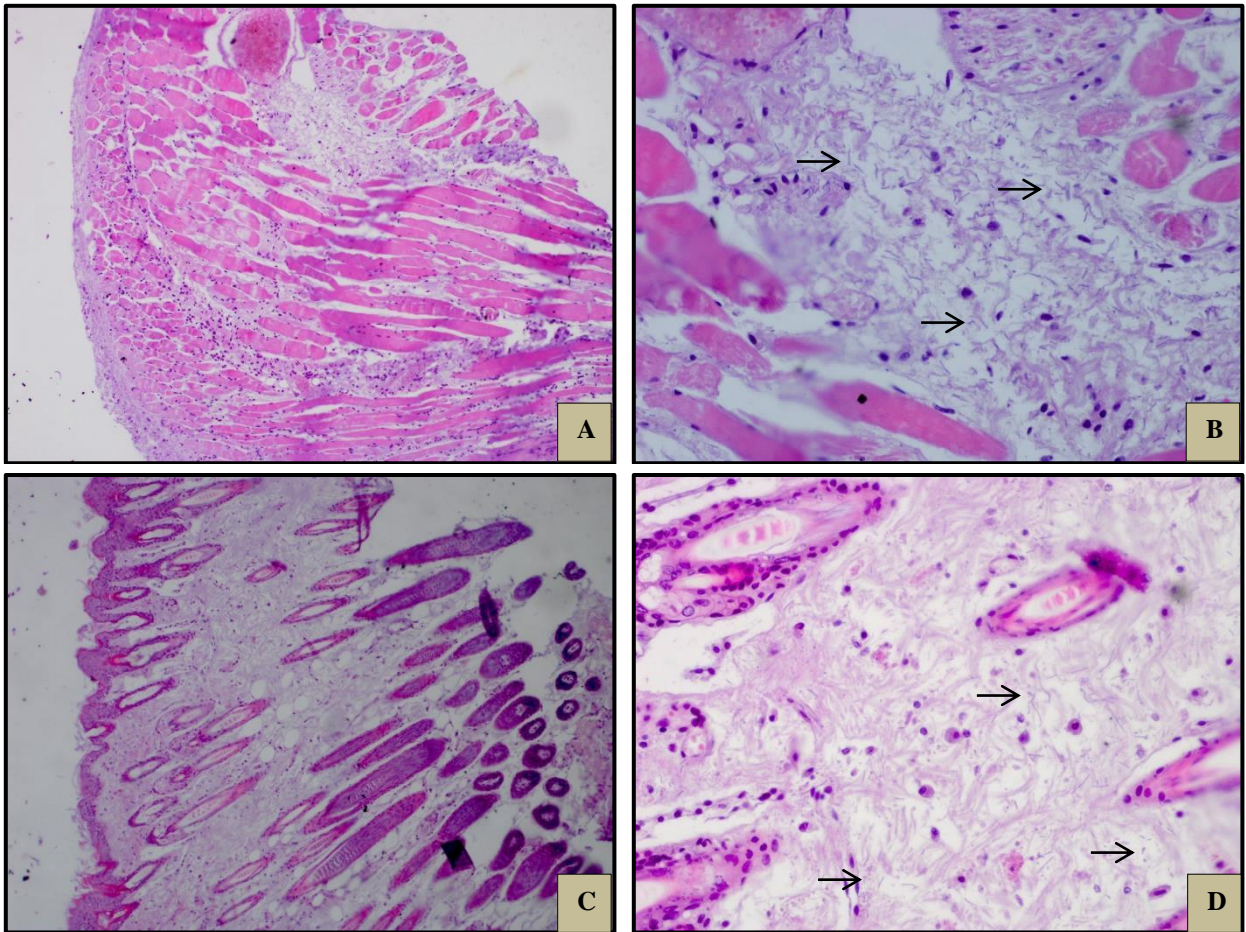


Figura 26. Lesões histológicas e impressão de fígado de camundongo com inoculação de meio de Tarozzi cultivado com amostras de infartos colhidos de órgãos de bovinos na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*. **A.** Musculatura esquelética com edema entre as fibras, necrose e eosinofilia de fibras e grande quantidade de bastonetes basófilos, associado a infiltrado inflamatório mononuclear leve e hemorragia (HE, obj. 4). **B.** Detalhe de A, evidenciação de bastonetes basófilos em meio ao edema entre as fibras (setas) (HE, obj. 40). **C.** Pele com edema na derme e infiltrado inflamatório leve (HE, obj. 4). **D.** Detalhe de C, evidenciação de bastonetes basófilos na derme (setas) (HE, obj. 40).

4.4.2 Identificação da espécie envolvida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A identificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada no Laboratório de Bacteriologia da UFSM e os resultados constam na Tabela 9.

A eletroforese em gel de agarose resultou positiva para *Clostridium septicum* (Figura 27) em fígados de camundongos semeados em meio de Tarozzi para três camundongos (Camundongo 29 – Bovino 3, Amostra de fígado; Camundongo 31 – Bovino 3, Amostra de linfonodo; Camundongo 34 – Bovino 2, Amostra de pulmão), correspondentes aos bovinos com intoxicação aguda experimental por *P. arachnoideum* e, em um camundongo (Camundongo 44 – Amostra de fígado) que corresponde à necropsia realizada pelo setor de patologia.

Tabela 9. Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase realizados no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) – UFSM, de fígado de camundongo inoculado, meio de Tarozzi utilizado para o crescimento bacteriano, através do cultivo de amostras de áreas de infarto e do raspado do crescimento total de colônias bacterianas no ágar sangue

Camundongo Amostra	PCR 1 Tarozzi e raspado de colônias de ágar sangue		PCR 2 Fígados dos camundongos semeados em Tarozzi				PCR 3 Fígados dos camundongos
	<i>C.</i> <i>perfringens</i> tipo A	<i>C.</i> <i>chauvoei</i> gene flic	<i>C. chauvoei</i> gene flic	<i>C. chauvoei</i> gene recA	<i>C. novyi</i> Tipo A	<i>C.</i> <i>septicum</i>	<i>C. chauvoei</i> gene flic <i>C. chauvoei</i> gene recA
23 38792 (pulmão)	-	-	-	-	-	-	-
29 40284 (fígado)	-	-	-	-	-	+	-
31 40284 (linfonodo)	-	-	-	-	-	+	-
34 40332 (pulmão)	-	-	-	-	-	+	-
44 40385 (fígado)	-	-	-	-	-	+	-

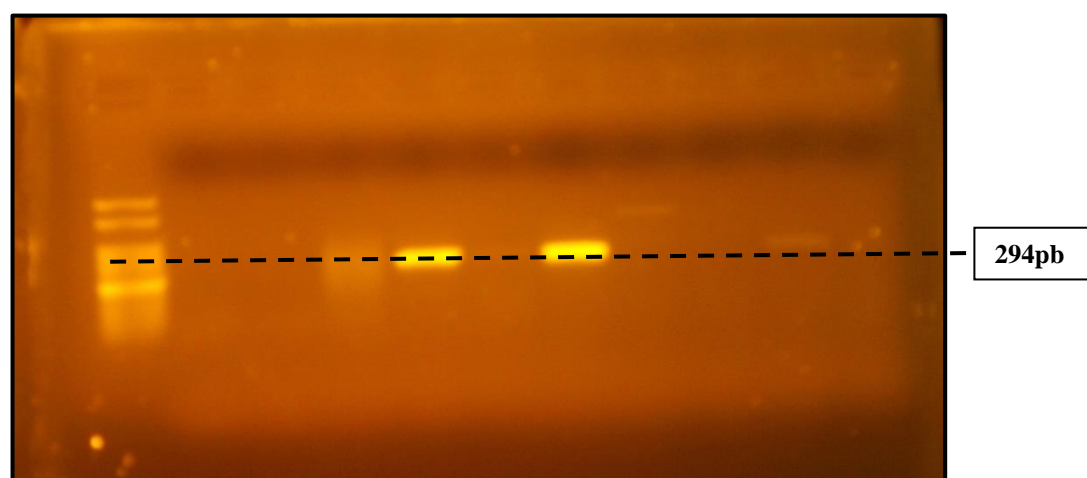


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose. Reação em cadeia da Polimerase. Marcações positivas para *Clostridium septicum* (traço). Gene FliC – *C. septicum*: 294pb (SASAKI et al., 2002).

5 DISCUSSÃO

Em Santa Catarina a intoxicação por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* é causa de morte de numerosos bovinos. Verificou-se neste estudo que dentro das três formas de intoxicação causadas por esta planta, a intoxicação aguda foi a mais frequente com 52%, seguido de carcinomas do trato digestivo superior com 33% e da hematúria enzoótica com 15%.

A diátese hemorrágica manifestou-se durante o ano todo, com maior concentração no outono. Gava (1993) e Anjos et al. (2008) descreveram que casos de diátese ocorrem principalmente na primavera (outubro-dezembro) e Tokarnia et al. (1967) opinam que em regiões com temperatura elevada podem ocorrer durante o ano todo. Foi observado neste estudo que, em anos que a temperatura se manteve constante, sem o inverno muito rigoroso, a samambaia brotava durante quase todo o ano. Em anos em que o inverno foi muito rigoroso, a samambaia brotou mais tarde, e não foram observados brotos no início da primavera, o que fez com que a doença ocorresse mais tarde, no verão e até mesmo no outono. No ano de 2012, houve precipitação de neve no inverno, e a brotação que normalmente aparecia em início de setembro, começou a aparecer em meados de outubro.

Nos últimos anos não ocorreram muitos casos de intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*, nem das duas outras formas de intoxicação. Provavelmente devido ao conhecimento desta intoxicação por parte de médicos veterinários e produtores, estes prescindiram dos serviços do Laboratório de Patologia ou houve desinteresse pelos mesmos em definir o diagnóstico.

A ingestão de *P. arachnoideum* pelos bovinos ocorreu em propriedades com escassez de pastagens, bem como em propriedades com boa oferta de pastagens. Notou-se que uma vez tendo ingerido a planta, os animais adquiriam um certo gosto pela planta, que podemos interpretar como vício. Os bovinos manifestavam interesse pela brotação mesmo quando não estava disponível nos piquetes, procurando-a em beiradas de cercas. O vício também foi observado nos Bovinos 1 e 2, utilizados na experimentação, que ingeriram a planta vigorosamente, sem deixarem sobras.

Em relação ao período de ingestão e à quantidade de *P. arachnoideum* ingerida, em alguns relatos de produtores, os animais permaneciam de 15-20 dias em piquetes que continham grande quantidade de samambaia. Outras vezes havia grande quantidade de brotação sem definição de quanto tempo os animais permaneciam nesses piquetes. A diátese hemorrágica é descrita quando os animais ingerem quantidades maiores que 10g/kg por período de duas a oito semanas (EVANS et al., 1954; EVANS, 1961; HOPKINS, 1986) ou quando o peso da planta ingerida se iguala ao peso do animal (TOKARNIA et al., 2012). Acredita-se que em locais com grande infestação de brotos de *P. arachnoideum*, sob condições naturais, os bovinos ingeriram doses muito maiores que 10g/kg e a doença se manifeste mais rapidamente.

Anjos et al. (2009) reproduziram a doença com doses diárias de 8; 8,6; 10,2 e 10,5g/kg em 53, 57, 58 e 58 dias, o que correspondeu a 59,3; 63,3; 47,4 e 47,5% de planta ingerida em relação ao peso dos animais. No presente trabalho, as doses utilizadas na experimentação foram de 20, 20, 14 e 10g/kg, no período de 82, 94, 46, 76 dias, e correspondeu a 149,76; 180,6; 71 e 75,2% de planta ingerida em relação ao peso dos animais. Nos Bovinos 1 e 2 a dose e o período para que manifestassem os sinais clínicos foram o dobro do que o encontrado na literatura pelo

autor; estes mesmos bovinos ingeriram quantidades da planta superiores a 70% em relação ao seu peso, diferente dos 47% a 63% observados por Anjos et al. (2009).

Neste estudo experimental, notou-se que os brotos de *P. aracnoideum* no início do experimento (novembro de 2013) eram mais viçosos, com um teor de água e suculência maiores. Com o passar dos dias (final de dezembro-início de janeiro de 2014), os brotos perderam a suculência e ficaram mais fibrosos. Acredita-se que a quantidade de princípio tóxico foi maior nesta última época, o que favoreceu as manifestações clínicas. Este fato pode ter favorecido a menor dose e o menor peso de planta em relação ao peso dos animais nos Bovinos 3 e 4, que ingeriram 14 e 10g/ kg, que correspondeu a 71 e 75,2% do peso dos animais. Estes bovinos iniciaram o experimento um mês mais tarde que os Bovinos 1 e 2, no início de dezembro. É descrito que todas as partes da planta são tóxicas, porém a concentração do ptaquilosídeo varia consideravelmente com a idade e a parte da planta (EVANS et al., 1961; HIRONO et al., 1973; SAITO et al., 1989). O maior nível do ptaquilosídeo no broto ocorre na primavera e declina gradualmente próximo ao inverno (SMITH et al., 1999); com a maturidade da planta a toxicidade diminui (TOKARNIA et al., 2012). A variação entre os experimentos pode ter ocorrido devido também a variação na quantidade de ptaquilosídeo presente nas diferentes regiões, e a quantidade sazonal do princípio tóxico durante o experimento.

Os sinais clínicos manifestados pelos bovinos do presente estudo, intoxicados naturalmente ou experimentalmente, são semelhantes aos descritos por Sippel (1952), Evans et al. (1954c); Tokarnia et al. (1967), Döbereiner et al. (1967), Barros et al. (1987), Valli (1992), Anjos et al. (2008), Anjos et al. (2009) e Furlan et al. (2014) e foram caracterizados por pelos arrepiados, salivação, perda de apetite, perda de peso, dispneia, fezes enegrecidas e fétidas ou diarreicas com sangue. Havia desidratação grave, febre (41-42°C), mucosas pálidas, petéquias na conjuntiva, gengiva e mucosa vulvovaginal, ulcerações nas narinas e epistaxe, períodos em decúbito, com hemorragias frequentes no local de picadas de insetos e traumas e sangue aquoso. Foi relatada a presença de sangue na urina (ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009) e no leite (ANJOS et al., 2008), o que não foi observado nos casos naturais e experimentais do presente estudo. O Bovino 3 não apresentou febre, provavelmente pelo curso clínico curto e a morte rápida; todos os outros bovinos, o acompanhado clinicamente e naqueles que foram realizadas somente as necropsias, tinham histórico de aumento na temperatura. Nos outros bovinos a duração dos sinais clínicos foi mais longa, em torno de seis dias. Estes foram semelhantes aos descritos nas formas espontânea e experimental (NAFTALIN e CUSHINE, 1965; TOKARNIA et al., 1967; VALLI, 1992; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009).

As lesões macroscópicas de bovinos na intoxicação aguda por *P. aracnoideum* foram variadas entre os casos naturais e os casos experimentais deste estudo. Nos bovinos que morreram rapidamente, como no Bovino 3, utilizado na experimentação, e em bovinos em que foram realizadas as necropsias e que havia o histórico de morte rápida, as hemorragias não tinham gravidade acentuada, apesar de muitas vezes estarem presentes. Nestes casos havia infartos localizados principalmente em fígado, pulmão e intestino. Infartos foram observados também em órgãos como língua, timo, linfonodo, rim, rúmen, abomaso, baço e coração. Os infartos foram descritos em fígado, em rim e baço, neste último menos frequentemente (ANJOS et al., 2008; 2009). No presente estudo, animais que apresentavam infartos significativos no fígado, tiveram morte rápida.

Nos bovinos em que os sinais clínicos tiveram duração maior, em torno de seis dias, as lesões hemorrágicas tinham maior intensidade, com a presença ou não de infartos. As lesões hemorrágicas foram semelhantes às aquelas encontradas por outros autores (SIPPEL, 1952;

TOKARNIA et al., 1967; BARROS et al., 1987; VALLI, 1992; TOKARNIA et al., 2000; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009; FURLAN et al., 2014).

As hemorragias, rarefação e desaparecimento do tecido hematopoético, focos de necrose com agregados bacterianos no fígado e no intestino observados ao exame histológico, foram semelhantes às descritas na literatura (SIPPEL, 1952; EVANS et al., 1954c; TOKARNIA et al., 1967; TOKARNIA et al., 2000; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009; FURLAN et al., 2014). No presente estudo, foram encontrados infartos no fígado, pulmão, coração, timo, intestino, língua, baço, rim, com ou sem agregados de bastonetes basofílicos. A morfologia destes bastonetes foi semelhante em todos os casos.

Os infartos no fígado são causados por embolias bacterianas ou trombose séptica em pequenos ramos da veia porta, sinusoides e veia central (VALLI, 1992). Explica-se que a origem das hemorragias deve-se ao aumento da fragilidade capilar, como provável consequência da trombocitopenia persistente e febre (VALLI, 1992; RADOSTITS et al., 2002). É provável que os bovinos tiveram morte mais rápida devido à septicemia e à embolia bacteriana após a ingestão de doses elevadas de *P. arachnoideum*.

Neste estudo ainda foram observadas no fígado necrose de coagulação centrolobular sem agregados bacterianos e degeneração de hepatócitos na periferia ou no centro do lóbulo, devido à provável anemia dos animais. Na musculatura esquelética, algumas vezes havia necrose e eosinofilia de fibras, associadas a edema entre as fibras e à presença de bastonetes basofílicos. Em todos os casos estudados observou-se pouca ou nenhuma reação celular associada às embolias bacterianas, ou nas áreas de necrose em locais de infarto, como também foi descrito por Valli (1992). Nos camundongos que morreram naturalmente após a inoculação do meio de cultivo de Tarozzi, foram observadas lesões histológicas na musculatura esquelética semelhantes às que ocorreram nos bovinos. Na pele dos camundongos havia edema na derme, infiltrado inflamatório mononuclear e bastonetes basofílicos, o que não foi observado nos bovinos. A explicação seria a presença de aplasia de medula óssea nos bovinos com intoxicação aguda por *P. arachnoideum* com diminuição ou ausência de tecido hematopoético e a normalidade da medula óssea nos camundongos, que resulta em recrutação de células inflamatórias nos tecidos.

Ao exame histológico foi possível observar, em alguns casos, a presença de bolhas de gás em áreas de necrose, mas também em áreas de tecido normal, principalmente no fígado e linfonodos. Ressalta-se aqui que se forem avaliadas as lesões somente na área de necrose, tem-se a falsa impressão que havia autólise do tecido com produção de gás e presença de bacilos da putrefação. Logo ao percorrer o campo nota-se que havia tecidos sem alteração somente com as bolhas de gás com ou sem a presença de bastonetes. Estes bastonetes posteriormente identificados como do gênero *Clostridium*, devido às suas características morfológicas de bastonetes basofílicos Gram positivos e bactérias produtoras de gás, nos levou a suspeitar do envolvimento das mesmas nessas lesões. A presença destas bactérias nessas lesões foi confirmada pelo cultivo bacteriano em meio de Tarozzi, (específico para crescimento de bactérias anaeróbias produtoras de gás) onde houve o crescimento de clostrídios produtores de gás e na inoculação em camundongo por via subcutânea do meio de Tarozzi, o que resultou na morte dos camundongos de cinco a nove horas após a inoculação, o que confirmou que eram *Clostridium* patogênicos.

Os bastonetes observados nos infartos e associados às lesões histológicas foram identificados pela reação em cadeia da polimerase como *Clostridium septicum*. Esta bactéria é uma das espécies de *Clostridium* isoladas no edema maligno, doença caracterizada por mionecroses e que ocorre quando há a contaminação de feridas por essas bactérias

(RADOSTITS et al., 2002); elas produzem várias toxinas, que tem ações hemolítica e necrosante (JONES et al., 2000), que causam danos no endotélio vascular e na membrana plasmática muscular (PERDRIZET 1987). As bactérias do gênero *Clostridium* são bactérias normalmente isoladas de fígados sadios (KRIEK e ODENTAAL, 1994). A intoxicação aguda por *P. arachnoideum*, causa aplasia de medula óssea e severa anemia, com conseqüente diminuição no teor de oxigênio na região centrolobular; esse ambiente propício possibilita a proliferação dessas bactérias o que culmina com as embolias e os infartos.

Ao comparar as lesões histológicas na musculatura esquelética do Bovino 3 utilizado na experimentação, com a dos camundongos que morreram naturalmente após inoculação do meio de cultivo de Tarozzi verifica-se que foram semelhantes, com excessão do infiltrado inflamatório, que não foi observado no Bovino # e nem nos demais bovinos com intoxicação aguda. Estas lesões musculares são observadas em bovinos acometidos por edema maligno, porem as lesões nessa enfermidade possuem maior gravidade e há infiltrado inflamatório. Estas diferenças se explicam pela presença de aplasia de medula óssea na intoxicação aguda por *P. arachnoideum* e a ausência desta mesma lesão nos camundongos e em bovinos com edema maligno.

O exame hematológico de bovinos com diátese hemorrágica revela trombocitopenia, aumento no tempo de coagulação e neutropenia (SIPPEL, 1952; TOKARNIA et al., 1967; BARROS et al., 1987). No bovino acompanhado clinicamente, e nos bovinos intoxicados experimentalmente, houve diminuição das plaquetas e hematócrito, e houve uma queda significativa no leucograma, o que ocorreu nos bovinos intoxicados experimentalmente por Anjos et al. (2009), que observaram leucopenia por neutropenia e trombocitopenia.

O ptaquilosídeo tem ação radiomimética semelhante à radiação responsável pela anemia aplástica (YOUNG, 2002). Há aplasia de medula óssea, com rarefação e ausência de tecido hematopoético. A síndrome hemorrágica ocorre por danos permanentes na parede de vasos sanguíneos e aumento de sua permeabilidade (EVANS 1968; FENWICK, 1988; HIRONO et al., 1984).

Com relação às lesões macroscópicas e microscópicas não foram observadas diferenças entre os Bovinos 1 e 2, que foram vacinados, e os Bovinos 3 e 4, que não receberam vacina contra as clostridioses. Os Bovinos 2, 3 e 4 apresentaram bastonetes em infartos, e no Bovino 1, foram observados bastonetes na submucosa intestinal. O uso de vacina composta por cultura inativada de *Clostridium chauvoei* e toxoides de *C. botulinum* tipo C e D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* tipo B, C e D e *C. sordelli*, não influenciou nas lesões causadas pela intoxicação aguda por *P. arachnoideum*.

Para o diagnóstico diferencial da intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* devem ser consideradas enfermidades com sintomatologia semelhante (BARROS et al., 1987; TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000). A Tristeza parasitária bovina é a principal doença a ser considerada uma vez que, médicos veterinários e produtores podem confundir os sinais clínicos por serem similares. A intoxicação aguda por *P. arachnoideum* deve ser diferenciada da hemoglobinúria bacilar; nesta a epidemiologia é diferente da ocorrida na diátese hemorrágica (SIPPEL, 1952).

6 CONCLUSÕES

- A intoxicação por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em bovinos é de grande importância em Santa Catarina.
- O quadro agudo ocorre com maior frequência, sua incidência depende das condições climáticas e pode ocorrer durante o ano todo.
- Há variação da quantidade do princípio tóxico entre regiões com *P. arachnoideum*, assim como no mesmo local em relação ao broto. Os brotos no início da brotação, quando estão muito viçosos e com maior quantidade de umidade, têm toxicidade maior em relação aos brotos que têm umidade diminuída e se apresentam mais fibrosos.
- O tromboembolismo séptico por bactérias do gênero *Clostridium* explica a patogenia dos infartos em seus diversos órgãos e encurtam o período de evolução da intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*.
- Ao exame histológico, as lesões de necrose com bastonetes basofílicos e bolhas de gás, sem lesões inflamatórias sugerem autólise, na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*, essas lesões ocorrerem entremeadas a tecido sem alterações de autólise.
- Em nosso estudo, os bastonetes envolvidos nas lesões histológicas na intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* são *Clostridium septicum*. Estas bactérias quando presentes podem agravar as lesões, provocando a morte mais rápida.
- A vacinação dos animais contra clostridioses não influenciou na gravidade e nem nas características clinico-patológicas da intoxicação aguda por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNEW P. M. e LAUREN D. M. Determination of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium esculentum*). *Journal of the Chromatography*, v.538, p.462-468, 1991.
- ALMONT N. Fern Poisoning. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v.7, p.165-167. (Cit. Fenwick 1988)
- ALONSO-AMELOT M.E.; CASTILHO U.; DE JONGH F. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. *Le lait*. v.73, p.323-332, 1993.
- ALONSO-AMELOT M. E.; CASTILHO U.; SMITH B. L. e LAUREN D. R. Bracken ptaquiloside in milk. *Nature*, v.82, p.587, 1996.
- ALONSO-AMELOT M. E. e AVENDANO M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Current Medicinal Chemistry*, v.9, p.675-686, 2002.
- ALONSO-AMELOT M. E. The chemistry and toxicology of bioactive compounds in bracken fern (*Pteridium* spp.) with special reference to chemical ecology and carcinogenesis. *Studies in Natural Products Chemistry*, v.26, p.685-739, 2002.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS, A.; CALCAGNO-PISARELLI, M. P. Phenolics and condensed tannins in relation to altitude in neotropical *Pteridium* spp. A field study in the Venezuelan Andes. *Biochemical Systematics and Ecology*. v.32, p.969-981, 2004.
- ANJOS B.L., IRIGOYEN L. F.; FIGHERA, R.; GOMES, A. D.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.28, n.10, p.501-507, 2008.
- ANJOS B.L.; IRIGOYEN L. F.; PÍAZER, J. V. M.; BRUM, J. S.; FIGHERA, R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.29, n.9, p.753-766, 2009.
- BARROS C.S.L.; GRAÇA D. L.; SANTOS M. N. e BARROS S. S. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Hora Veterinária*, v.7, n.37, p.333-339, 1987.
- BASILE J.R.; REIS A.C.F.; GASTE L. Intoxicação aguda de bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*) L. Kuhn) no Estado do Paraná. *Revista Setor Ciências Agrárias*, p.167-170, 1981.

- BENESI F. J. et al. Avaliação de um surto de intoxicação aguda causado pela ingestão de samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) em bovinos criados em Paraibuna, SP. Aspectos clínico-hematológicos. Anais XVI Congresso Mundial de Buiatria, Salvador, Bahia, Tomo II, p.13-17, 1990.
- BROBST D. F. e OLSON C. Neoplastic and proliferative lesions of the bovine urinary bladder. *American Journal of Veterinary Research*, v.24, p.105-111, 1963.
- CAMPO, M.S.; JARRET, W.F.H.; BARRON, R.; O'NEIL, B.W.; SMITH, K.T.; Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research*, v.52, p.6898–6904, 1992.
- CAMPO, M.S.; BENISTON, R.G.; CONNOLLY, J.A.; GRINDLEY, G.J. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In: Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control, J. Taylor and R.T. Smith, Eds, *International Bracken Group Special Publication*, n. 4, Manchester, UK, p. 116–122. 1999.
- CARVALHO T.; PINTO C. e PELETEIRO M.C. Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v.134, p.336-346, 2006.
- DINIZ, J. M. F.; BASILE, J. R.; CAMARGO, N. J. Intoxicação natural de asininos por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.36, n.5, p.515-522, 1984.
- DÖBEREINER J.; TOKARNIA C.H. e CANELLA C.F.C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.2, p.489-504, 1967.
- DURÃO, J. F. C.; FERREIRA, M. L.; CABRAL, A. et al. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.5, n.1, p.11-20, 1995.
- EVANS, E. T.; EVANS, W. C.; ROBERTS, H. E. Studies of bracken fern poisoning in the horse. *British Veterinary Journal*, v.105, p.175-186, 1951.
- EVANS, W.C.; EVANS, E.T.R. & HUGHES, L.E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part I. *British Veterinary Journal*, v.110, n.8, p.295-306, 1954a.
- EVANS, W.C.; EVANS, E.T.R. & HUGHES, L.E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part II. *British Veterinary Journal*, v.110, n.9, p.365-380, 1954b.
- EVANS, W.C.; EVANS, E.T.R. & HUGHES, L.E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part III. *British Veterinary Journal*, v.110, n.10, p.426-444, 1954c.

- EVANS W. C.; EVANS I. A.; THOMAS A. J.; WATKINS J. E. e CHAMBERLAIN A. G. Studies on bracken poisoning in cattle – Part IV. *British Veterinary Journal* v.114, n.5, p.180-198, 1958.
- EVANS W. C.; EVANS I. A., AXFORD R. F. E., THRELFALL G.; HUMPHREYS D. A. e THOMAS A. J. Studies on bracken poisoning in cattle – part VII. The toxicity of bracken rhizomas. *Veterinary Record*, v.73, n.35, p.852-853, 1961.
- EVANS, W. C. Bracken poisoning of farm animals. *Veterinary Record*, v.76, n.13, p.365-369, 1963
- EVANS I. A.; JONES R. S.; MAINWARING-BURTON R. Passage of bracken fern toxicity into milk. *Nature*, v.237, p.107-108, 1972.
- EVANS I. A.; OSMAN M. A. Carcinogenicity of bracken and shikimic acid. *Nature*, v.250, n.5464, p.348-349, 1974.
- EVANS W. C. Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. *Journal of the proceedings of the Linnean Society*, v.73, p.113-131, 1976.
- FENWICK, G.R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) – Toxic effects and to constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.46, p.147-173, 1988.
- FUKUOKA M.; KUROYONAGI, M.K.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S. Chemical and toxicological studies on bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*: II. Structure of pterosins, sesquiterpenes having 1-indanone skeleton, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.26, p.2365–2385, 1978.
- FURLAN F. H. ; MENDES E. R. S.; DUCATTI, K.R.; MARCON G.C.; DOMBROSKY T.; AMORIM T. M.; RIET-CORREA F. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v.34, n.4, p.343-348, 2014.
- FRANÇA N. F.; TOKARNIA C. H. e PEIXOTO P.V. Enfermidades determinadas pelo principio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.3, p.85-96, 2002.
- GABRIEL A. L.; KOMMERS G. D.; MUSUDA E. K.; FIGHERA R. A.; PIAZER J. V. M.; BARROS C. S. L.; MARTINS T. B. e ROSA F. B. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.7, p.515-525, 2009.
- GAVA, A. Intoxicações por plantas de ação anti-hematopoética e mutagênica. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. Intoxicações por Plantas e Micotoxicoesem Animais Domésticos. Montevideo: Editorial AgropecuariaHemisferio Sur, 1993. cap.12, p. 247-258.

- GAVA, A. Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*) Poisoning in Cattle in Southern Brazil. *Veterinary and Human Toxicology*, v.44, n.6, p.362-365, 2002.
- GALVÃO A.; BRITO M. F.; ARAGÃO A. P.; YAMASAKI E. M.; PEIXOTO P. V. e TOKARNIA C. H. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.9, p.887-902, 2012.
- GIL da COSTA, R. M. et al. Bracken-associated human and animal health hazards: chemical, biological and pathological evidence. *Journal Hazards Materials*, v.203-204, p.1-12, 2012.
- GONZÁLES C.E.; CHAVERA A.C.; PERALES R.C.; FALCÓN N.P. e EVARISTO R.R. Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de Oxapampa, Pasco. *Rev Inv Vet Peru*, v.15, n.1, p.25-36, 2004.
- HARBUTT P. R. e LEAVER D. D. Carcinoma of the bladder of sheep. *Australian Veterinary Journal*, v.45, p.473-475, 1969.
- HAYASHI, T. Application of jamshidi's needle to bone marrow biopsy and diagnosis of bracken poisoning in cattle. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, v.34, p.206-211, 1981.
- HIRONO I., SHIBUYA C.; FUSHIMI K. e HAGA M. Studies on carcinogenic properties of bracken, *Pteridium aquilinum*. *Journal of the National Cancer Institute*, v.45, p.179-188, 1970.
- HIRONO I., SHIBUYA C.; SHIMIZU M. e FUSHIMI K. Carcinogenic activity of processed bracken used as human food. *Journal of the National Cancer Institute*, v.48, p.1245-1250, 1972.
- HIRONO I.; FUSHIMI K.; MORI H.; MIWA T. e HAGA M. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. *Journal of the National Cancer Institute*, v.50, n.5, p.1367-1371, 1973.
- HIRONO I., FUSHIMI K. e MATSUBARA N. carcinogenicity test of shikimic acid in rats. *Toxicology Letters*, v.1, p.9-10, 1977.
- HIRONO I.; UENO I.; HOSAKA S.; TAKANASHI H.; MATSUSHIMA T. SUGIMURA T. e NATORI S. Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Letters*, v.12, p.15-18, 1981.
- HIRONO I.; AISO S.; YAMAJI T.; MORI H.; YAMADA K.; NIWA H.; OJIKI M.; WAKAMATSU K.; KIGOSHI H.; NIIYAMA K. e UOSAKI Y. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. *Gann* v.75, p.833-836, 1984a.

- HIRONO I.; KONO Y.; TAKAHASHI K.; YAMADA K.; NIWA H.; OJIKA M.; NUYAMA K. e UOSAKI Y. Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituinte. *Veterinary Record*, v.115, n.15, p.375-378, 1984b.
- JONES C. T.; HUNT R. D.; KING N. W. Molestias causadas por bactérias. *In: Eds Patologia Veterinária*, 6ª ed. Editora Manole: Barueri, 2000. 1415p., p.423-513.
- KRIEK, N. P. J.; ODENDAAL, M. W. Botulism. *In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (ed.) Infections diseases of livestock*. Cape Town: Oxford Press, p.1354-1371, 1994.
- LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil. Nova Odessa: Franciscana, 1982. 425p.
- LUCENA, R. B.; RISSI D. R.; KOMMERS G.D.; PIEREZAN F.; OLIVEIRA-FILHO J. C.; MÂCEDO J. T. A.; FLORES M. M. e BARROS C. S. L. A retrospective study of 586 tumors in Brazilian cattle. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v.145, p.20-24, 2011.
- MARTINI-SANTOS, B.J. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação experimental por *pteridium arachnoideum* (Dennstatiaceae) em equinos. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária UFRRJ, 2010.
- MARÇAL W. S. et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) em bovinos da raça Aberdeen Angus. *Archives of Veterinary Science*, v.7, p.77-81, 2002.
- MARÇAL W.S. A intoxicação por samambaia em bovinos no estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrária*, v.24, p.197-208, 2003.
- MATOKA M.; SAITO E.; SAITO K.; KOYAMA K.; NATORI S.; MATSSHIMAT.; TAKIMOTO M. assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*, v.2, p.419-425, 1987.
- McCREA C. T. e HEAD K. W. Sheep tumours in North East Yorkshire. I. Prevalence on seven moorland farms. *British Veterinary Journal*, v.134, p.454-461, 1978.
- MORINO K.; MATSUKURA N.; KAWACHI T.; OHGAKI H.; SUGIMURA T. e HIRONO I. carcinogenicity test of quercetin and rutin in golden hamster by oral administration. *Carcinogenesis*, v.3, p.93-95, 1982.
- NAFTALIN, J.M. & CUSHNIE, G.H. Pathology of bracken poisoning in cattle. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v.64, p.54-74, 1954.
- NIWA H.; OJIKA M.; WAKAMATSU K.; YAMADA K.; MATSUSHITA K. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpine glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Tetrahedron*, v.24, p.4117-4120, 1983.

- OLIVEIRA L. G. P. Novos aspectos patológicos e patogênicos da hematuria enzootica bovina. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária UFRRJ, 2009.
- OLSON C.; PAMACKU A. M.; BROBST D. F. Papilloma virus and bracken fern. *Cancer Research*, v.25, p.840, 1965.
- PAMUCKU A. M. Investigations on pathology of enzootic bovine haematuria in Turkey. *Zentbl. Vet med*, v.2, p.409-429, 1955.
- PAMUCKU A. M.; PRICE J.M. e BRYAN G. T. Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumors. *Veterinary Pathology*, v.13, p.110-122, 1976.
- PAMUCKU A.M.; YALCINER S.; HATCHER J.F. e BRYAN G.T. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen presente in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research* v.40, p.3468-3472, 1980a.
- PAMUCKU A.M.; YALCINER S.; HATCHER J.F. e BRYAN G.T. carcinogenicity of tannin and tannin-free extracts of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, v.65, p.131-136, 1980b.
- PARKER W.H. e McCREA C.T. Bracken (*Pteris aquilina*) poisoning of sheep in the North York Moors. *The Veterinary Record*, v.77, n.30, p.861-865, 1965
- PEIXOTO, P.V.; FRANÇA, T.N.; BARROS, C.S.L.; TOKARNIA, H.C. Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.23, n.2, p.65-81, 2003.
- PENBERTHY J. Vegetable poisoning (?) Simulating anthrax in cattle. *The Journal of Comparative Pathology*, v.6, p.266-275 (cit. Fenwick 1988).
- PERDRIZET J. A.; CALLIHAN D. R.; REBHUN W. C.; SHIN S. J. Successful management of malignant edema caused by *Clostridium septicum* in a horse. *Cornell Veterinary*, v.77, n.4, p.328-338, 1987.
- PRICE J. M. e PAMUCKU A.M. The induction of neoplasms of the urinary bladders of the cow and the small intestine of the rat feeding bracken fern (*Pteris aquilina*), *Cancer Research*, v.28, p.2247-2251, 1968.
- PROPHET, E. B. et al. Laboratory methods in histotechnology. Washington: American registry of pathology, 274p, 1992.
- QUINN P. I.; MARKEY B. K.; CARTER M. E.; DONNELLY W. J. e LEONARD F. C. Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas. Porto alegre: Art Med 2005.

- RADOSTITS O. M.; GAY C. C.; BLOOD D. C.; HINCHCLIFF K. W. Doenças causadas por bactérias – II. In: eds. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002. p.676-700; 1737p.
- RAVE V. G., SANCHEZ F. O. e LUQUE F. E. estudio clinicopatológico de la hematuria vesical bovina. *Revta ICA*, Bogotá, v.13, n.4, p.671-679, 1978.
- RISSI D. R.; RECH R. R.; PIEREZAN F.; GABRIEL A. L.; TROST M. E.; BRUM J. S. KOMMERS G. D.; BARROS C. S. L. Intoxicação por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.7, p.261-268, 2007.
- SANTOS R.C.; BRASILEIRO F.G.; SILVA M.E. Tumorigenicity of boiling water extract fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), v.12, n.1, p.72-76, 1992.
- SASAKI Y.; KOJIMA A.; AOKI H.; OGIKUBO Y.; TAKIKAWAM N. e TAMURA Y. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemoliticum*, *Clostridium novyi* tipo A e B and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.257-267, 2002.
- SIPPEL, L. Bracken fern poisoning. *American Journal of Veterinary Research*, v.121, p.9-13, 1952.
- SHAHIN, M.; SMITH, B.L.; PRAKASH, A.S. Bracken carcinogens in the human diet. *Mutation Research*, v.443, p.69-79, 1998.
- SMITH, B.L. & BEATSON, N.S. Bovine enzootic haematuria in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.18, n.6, p.115-120, 1970.
- SMITH B.L.; LAUREN D.R.; PRAKASH A.S. Bracken fern (*Pteridium*): Toxicity in animal and human health. IV Int. Bracken Group Conf. - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester, p.76-85. 1999.
- STEPHEN J.; PIETROWKI R. A. Bacterial toxins 2nd. Ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986.
- SOUTO M. A. M.; KOMMERS G. D.; BARROS C. S. L.; RECH R. R. e PIAZER J.V. M. Neoplasmas da bexiga associados à hematuria enzoótica bovina. *Ciência Rural*, v.36, n.5, p.1647-1650, 2006.
- SOUZA M. V. e GRAÇA D. L. Intoxicação crônica por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Polypodiaceae) em bovinos. *Ciência Rural*, v.23, n.2, p.203-207, 1993.
- STORRAR D. M. Cases of vegetable poisoning in cattle. *The Journal of Comparative Pathology*, v.6, p.276-279, 1983. (cit Fenwick 1988).

- SUNDERMAN, F.M. Bracken poisoning in sheep. *Australian Veterinary Journal* v.64, n.1, p.25-26, 1987.
- THONSON, A. J.; MICKEL, J. T.; MEHLTRETER, K. Taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) of Laurasian affinity in Central and North America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.157, p.1-17, 2008.
- TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J. & CANELLA C.F.C. Ocorrência da intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*(L.) Kuhn) em bovinos no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.2, p.329-336, 1967.
- TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J. & CANELLA C.F.C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. II Estudos Complementares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.4, p.209-224, 1969.
- TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Plantas Tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000, 300 p.
- TOKARNIA, C.H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. B.; PEIXOTO, P.V.; DOBEREINER, J. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2.ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012, 565 p.
- TRYON, R.M. A revision of the genus *pteridium*. *Rhodora*, v.43, p.1-31, 37-67, 1941.
- VALLI V. E. O. The hematopoietic system. In: JUBB K. V. F.; KENNEDY P. C.; PALMER N. Pathology of Domestic Animals. 4^a ed. San Diego: Academic Press, v. 3 p. 101-265. 1992.
- VAN DE HOEVEN, J.C.M.; LAGERWIGI, W.J.; POSTHMUS, M.A.; VELHUIZEN, A.V.; HOLTERMAN, H.A.J. Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern *Pteridium aquilinum* L. Kuhn, *Carcinogenesis*, v.4, p.1587–1590, 1983.
- VILLALOBOS SALAZAR J.V., HERNANDES H.; MENESES A. e SALAZAR G. factors which may affect ptaquiloside levels in milk: effects of altitude, bracken fern growth stage, and milk processing. Proceedings of the international Bracken Group Conference – Bracken Fern: Toxicity, biology and control. Manchester, UK, p. 68-74, 1999.
- WANG C. Y.; CHIU C. W.; PAMUCKU A. M. e BRYAN G.T. Identification of carcinogenic tannin isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, v.56, p.33-36, 1976a
- WANG C. Y.; CHIU C. W.; PAMUCKU A. M. e BRYAN G.T. Bracken fern, a naturally occurring carcinogen. *Medicine Biologie Environnement* v.4, p.565-572, 1976b

WOSIAKI S. R. Papiloma vírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico. Dissertação (mestrado) CCA, Universidade Estadual de Londrina, 2000.

YOUNG N. S. Acquired aplastic anemia. *Annals of internal medicine*, v.136, p.534-546, 2002.

YOSHIHARA, K.; FUKUOKA, M.; KUROYANAGI, M.; NATORI, S. 1-indanone derivatives from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 19. 1491–1495. 1971.

ANEXOS

Anexo 1. Sinais clínicos observados em bovinos na intoxicação aguda experimental por *Ptedidium arachnoideum*

Bovino	Início da ingestão da planta/ Duração do experimento	Duração dos sinais clínicos	Sinais clínicos
1	1.11.13 84 dias	19.1.14- 23.1.14 (5 dias)	<p>17.01.14: Ingeriu toda a planta, comeu devagar e ficou escolhendo</p> <p>18.01.14: Iniciou com mucosas vermelho vivo e temperatura de 40,4°C (8h); Comeu a planta mas escolheu, sobrou 2,4 kg de 6,0kg de planta. Temperatura de 41,4°C (19h)</p> <p>19.01.14: Não comeu a planta. Ao soltá-lo no piquete, andava devagar, não comeu e permaneceu bom tempo deitado. Desidratação moderada, e não comeu ração no final do dia. Temperatura de 40,3 pela manhã e ao fim do dia 41,3°</p> <p>20.01: Diarreia esverdeada líquida, fétida e com poucos coágulos de sangue (coágulos pequenos), desidratação grave. Inquietação, deitava, levantava. E gemia muito. Temperatura de 38,9° pela manhã e ao fim do dia 40,7°</p> <p>21.01: Diarreia acentuada com grave desidratação e mucosas pálidas. Inquietação, deitava e levantava, gemia e o dorso estava arqueado. Temperatura 37,9° pela manhã e ao final do dia 40,2°. Hemorragia no septo nasal e na cavidade oral. Não se alimentava.</p> <p>22.01: Diarreia frequente com pequenos coágulos de sangue. Hemorragia nos membros por picadas de insetos e no septo nasal. Não se alimentou. Temperatura pela manhã 38° e ao final do dia 40,3°.</p> <p>23.01: Diarreia frequente, com pequenos coágulos de sangue, as 15 horas defecou grande quantidade de coágulos de sangue, desidratação grave. Sangue com baixa coagulabilidade (10 min para coagulação total), secreção nasal sanguinolenta leve, mucosas pálidas. Deitou as 16 horas, não levantou mais, progrediu para respiração ofegante. As 18:30h entrou em decúbito esternal e lateral. Morreu as 20:20hs. Temperatura oscilou em 38,2-38,4°</p>
2	01.11.14 95 dias	31.01- 03.02 (4 dias)	<p>20.12: Diarreia esverdeada sem coágulos, desidratação e temperatura 40,7°. Sangue aquoso, mas coagula rápido.</p> <p>21.12: Apático, fezes amolecidas sem sangue.</p> <p>22.12: Recuperou-se.</p> <p>30.01: Não ingeriu toda a samambaia, sobrou 0,6kg. Quando solto, ficou parado, não pastou e logo deitou, temperatura 39,5°.</p> <p>01.02: Ingeriu toda a planta. Pela manhã temperatura 40,5°. Lento, pasta pouco.</p> <p>02.02: Ingeriu apenas 0,5kg. Solto no piquete não come. Coágulos pequenos nas fezes. As 13hs temperatura 42,1° e permaneceu elevada até o dia seguinte. Respiração ruidosa, salivação excessiva, secreção nasal levemente avermelhada. Mucosa oral com hemorragia</p> <p>02.02: Temperatura pela manhã 40° e ao fim do dia 42,7°. Desidratação severa. Sangue com baixa coagulabilidade e secreção nasal sanguinolenta leve. Levantou, cambaleiou, não se alimentou. Inquieto, urinava com frequência</p> <p>03.02: Temperatura 39,7° pela manhã, agitado, saiu da baia, defecou fezes secas com coágulos de sangue. Gemia, respiração ruidosa e ofegante. Decúbito esternal e lateral. Sangue demorou cerca de meia hora para coagular. Hemorragia mais evidente na mucosa oral. As 10 horas deitou e não levantou mais, agravou a respiração, ficou em decúbito lateral e morreu as 14:15horas.</p>

“Tabela 6. Continuação”

3	03.12.13 49 dias	18.01- 19.01 (1 dia)	19.01 Pela manhã levantou cheirou a planta e não quis comer. Logo após deitou e não levantou mais. As fezes eram amolecidas com muco e poucos coágulos de sangue. Havia desidratação severa, mucosas pálidas e ausência de hemorragias. Respiração profunda e ruidosa. Temperatura de oscilou entre 38° e 37,5°. Morreu as 4horas.
4	03.12.13 74 dias	14.02- 19-02 (5dias)	<p>14.02: Sangramento nos membros por picadas de insetos. Ingeriu toda a planta, ração e pasto. Estava agitada, agressiva. As 18hs, a temperatura era 41°. As mucosas pálidas, desidratação leve, as fezes secas com poucos coágulos.</p> <p>15.02: Permanecia muito tempo deitada, só levantava com estímulos. A respiração era ruidosa. Quando em pé, o dorso estava arqueado. O sangue aquoso, secreção nasal sanguinolenta leve. Comeu a planta e pasto, as fezes eram secas, fétidas e com poucos coágulos. A noite deitada, levantou com dificuldade. Temperatura 39,6°.</p> <p>16.02: Fezes amolecidas mas formavam bolo fecal, havia muco e sangue Temperatura 40,4°. Comia bem, a respiração era ruidosa. Cambaleia e sangra por feridas. A noite temperatura 40,4°.</p> <p>17.02: Pela manhã temperatura 39,6°, comeu apenas 1kg de samambaia. Havia pingos de sangue na baia. A respiração era ruidosa e secreção nasal sanguinolenta moderada. Cambaleio e tremores musculares na região posterior. As 14hs deitou e relutou em levantar. As 15 horas não levantou mais, mas ainda comia e a temperatura 40,8° as 17horas.</p> <p>18.02: Decúbito esternal com cabeça voltada para o flanco. Não levantou mais, a respiração era ruidosa e não se alimentou. Ainda alerta ao meio. Permaneceu assim até o dia seguinte.</p> <p>19.02: Passou a noite em decúbito lateral com respiração bem profunda. Pela manha decúbito lateral, com salivacão acentuada. Sacrificada as 8horas.</p>