



**ENFERMEDAD CEREBELOSA EN BOVINOS OCASIONADA POR LA INGESTIÓN
 DE *Solanum bonariensis***

*Vendes JM¹, Monaña A², Gutiérrez F³, Battes
 D⁴, Guerrero F⁵, Goicoa A⁶, Fidalgo LE⁷, Riet
 Correa Jy, García y Santos C⁸ y*

Áreas Biofísica⁽¹⁾, Patología⁽⁶⁾ y Toxicología⁽⁴⁾ y Br. Vet.
⁽²⁾de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo,
 Uruguay. Facultad de Veterinaria de Lugo, USC,
 España⁽³⁾. Laboratorio Regional Diagnóstico, UFPel,
 Pelotas, RS, Brasil⁽⁷⁾.

RESUMEN

Se describe un desorden cerebeloso en bovinos, caracterizado por episodios de pérdida de equilibrio, aumento de la base de sustentación, extensión de la cabeza y de los miembros torácicos, opistótonos, nistagmo, caídas laterales y/o hacia atrás, atribuido a la ingestión natural o por suministro a través de fistula ruminal de *Solanum bonariensis*. Las principales características patológicas halladas en los bovinos intoxicados fueron vacuolización y degeneración de las células de Purkinje con presencia de esferoides axonales en la capa granulosa y en la sustancia blanca del cerebelo. Se comprobó por histología cuantitativa una reducción del número de células de Purkinje en el caso de intoxicación natural y una elevada presencia de esferoides en los bovinos intoxicados natural o experimentalmente. A partir de los resultados se establece una secuencia de lesiones que se iniciaría con la aparición de esferoides axonales en la sustancia blanca cerebelosa (síntomas leves), hasta llegar a la desaparición de la capa de células de Purkinje del cerebelo (síntomas severos). Esta secuencia nos lleva a proponer un origen del daño celular en la alteración de la síntesis de elementos del citoesqueleto o de otras proteínas específicas asociadas a éste, que determinarían la alteración del tráfico de organelos desencadenando los daños encontrados en las etapas finales de esta degeneración cerebelosa.

INTRODUCCIÓN

En diferentes regiones del mundo se ha reportado la ocurrencia de síndromes cerebelosos asociados a la ingestión de solanáceas^{1, 3, 4, 5}. En Uruguay ocurre un desorden cerebeloso similar asociado a la ingestión de *Solanum bonariensis* (nombre común: "naranjillo") -Figura 1-. No se ha reportado su reproducción experimental⁵. El presente trabajo describe la epidemiología, los signos clínicos, las principales lesiones microscópicas encontradas y la reproducción experimental de la enfermedad en el ganado bovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se observó la enfermedad en su forma natural en 2 establecimientos agropecuarios de Soriano, Uruguay (Seccional 4^a, ruta 95, Km 25½). Se sacrificaron 2 animales con síntomas nerviosos severos, procediendo a su necropsia. Se tomaron muestras del cerebro y cerebelo, las que fueron fijadas en formol neutro al 10%, incluidas en parafina, cortadas a 5µm y coloreadas con Hematoxilina y Eosina. Se seleccionaron cortes para colorear con las técnicas de Azul de Toluidina y Luxol Fast Blue. Una parte de las muestras fue procesada para microscopía electrónica, fijada en glutaraldehído al 2,5% en cacodilato de sodio, deshidratada en etanol e incluida en Epon. Los cortes semifinos fueron coloreados con azul de metileno y los ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados por microscopía electrónica de transmisión. Para la reproducción experimental se utilizaron 4 terneros machos, castrados, raza Holstein de 8 meses de edad. 3 terneros fueron dosificados diariamente con 10 gr/Kg PV de hojas frescas de la planta a través de una fistula ruminal. Un ternero fue mantenido como testigo. Cuando comenzaron los síntomas leves, se sacrificaron uno de los animales intoxicados y el testigo, procediendo a su necropsia, extracción y procesamiento de muestras. Se realizó la cuantificación en los cortes histológicos de cerebelo de los bovinos afectados (natural o experimentalmente) y del testigo. Para esto se realizaron cortes seriados, tomándose uno de cada 5 cortes para su observación. En 10 láminas así obtenidas se contaron las células de Purkinje; 50 campos por lámina a 400 aumentos. La planta utilizada para la reproducción experimental fue clasificada por E. Marchesi y J. Ren (Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía, UdelaR) y colectada en el predio de Sayago de la Facultad de Agronomía (UdelaR). Se realizó el estudio estadístico de las cuantificaciones de los cortes utilizando la prueba de igualdad de poblaciones (test de Kruskal-Wallis, programa Intercooled StataTM v. 7.0 -gentileza de A. Gil-), utilizando como medida de tendencia central el valor de la mediana de las 500 observaciones en cada caso.

RESULTADOS

Epidemiología: En los establecimientos visitados, la intoxicación es endémica desde 1980. La morbilidad varía dependiendo del año, de la raza y del tipo de producción. La mortalidad es menor al 1%, estando asociada generalmente a accidentes o al debilitamiento progresivo de los afectados. Los animales consumen la planta durante todo el año, incluso en épocas de abundancia de pastura de buena calidad. En el año 2000 la enfermedad tuvo una incidencia-densidad de 15-20% en un total de 1912 bovinos entre ambos establecimientos. El ganado lechero y sus cruas fueron los más sensibles. Los animales con síntomas visibles siempre fueron



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

mayores de 8 meses, afectando especialmente a las hembras buenas productoras y a los animales criados artificialmente (de los animales con sintomatología severa se observaron 7 Holstein de ambos sexos, desde terneros a vacas en ordeño y 1 vaca cruza Normando con ternero al pie).

Signos clínicos: Se caracterizaron por aparición de ataques periódicos. Los animales afectados parecían normales hasta que se excitaban (por ej. marcha forzada, agrupamiento, encierro de los animales y/o prueba de liberación súbita de la cabeza ⁴ –Head Release Test-). Los ataques típicos se manifestaron con rigidez del cuello y extensión de la cabeza, nistagmo, extensión de los miembros torácicos, caídas laterales o hacia atrás con opistótonos y temblores musculares. Los animales menos afectados no llegaban a caerse, mostrando la cabeza y los miembros torácicos extendidos y balanceo de la cabeza. También se observó un aumento de la base de sustentación durante el reposo y una marcha atáxica con movimientos hipermétricos. La duración de los signos fue desde algunos segundos a pocos minutos. Pasados estos episodios, los animales se incorporaban permaneciendo aparentemente normales, sin que hubiera existido una etapa de pérdida de conciencia durante los ataques. En algunos animales, se observaron signos clínicos permanentes tales como marcha dismétrica y/o mirada extraviada hacia arriba con inclinación de la cabeza y el cuello (Fig. 2).

Patología: En la necropsia, los animales no presentaron alteraciones macroscópicas evidentes. Las principales lesiones histológicas se encontraron en el cerebelo, presentando desde alteración de las células de Purkinje hasta la desaparición de esta capa celular (Fig. 3). Las células de Purkinje remanentes se mostraban tumefactas, pálidas, con pérdida de la sustancia de Nissl y una fina vacuolización de su citoplasma (Fig. 4). Otras contenían una o más vacuolas grandes. El núcleo se hallaba picnótico o distendido y desplazado hacia la periferia de la célula (Fig. 5). A continuación de estos

cambios degenerativos las células de Purkinje aparentemente desaparecían dejando el espacio vacío. También se observaron esferoides axonales en la sustancia blanca y en la capa granulosa de la corteza y microcavitaciones en la sustancia blanca del cerebelo (Fig. 6).

Intoxicación experimental en bovinos: Los datos resumidos sobre las cantidades de planta consumidas y los pesos de los animales hasta la observación de los primeros signos clínicos se muestran en la Tabla 1.

Los primeros signos clínicos en los animales intoxicados experimentalmente fueron evidentes luego de 136 días de haberles suministrado la planta diariamente, apareciendo síntomas leves en los 3 animales. El cuadro cerebeloso se provocó fácilmente al realizar el test de liberación de la cabeza en los animales, llegando a caerse, o mostrando la cabeza y los miembros torácicos extendidos y balanceo de la cabeza de un lado al otro. Los estudios histológicos mostraron numerosas células de Purkinje con cambios degenerativos y una delicada vacuolización citoplásmica similar a la observada en los casos de intoxicación natural. No se encontraron diferencias significativas en el número de células de Purkinje de este animal con el animal testigo (Tabla 2), aunque la sustancia blanca y la capa granulosa de la corteza cerebelosa mostraban gran número d

Histología cuantitativa: El estudio de la corteza cerebelosa y de la sustancia blanca mostró: i. Con relación a la mediana del número de células por campo para el animal intoxicado naturalmente, este valor fue de 1 célula/campo, mientras que para el testigo fue de 3 células/campo. El test de Kruskal-Wallis rechazó la igualdad con una $p=0.0001$, mostrando una diferencia muy significativa del número de células/campo en el animal intoxicado naturalmente (con síntomas severos) con respecto al testigo y al intoxicado experimentalmente (con síntomas leves). El número de células/campo separado por categorías se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1: Intoxicación experimental con *Solanum bonariensis* en terneros Holstein.

Ternero N°	Día inicial		Primeros signos	
	Peso (Kg PV)	Peso (Kg PV)	Planta consum. (Kg)	Kg planta/Kg PV
1	133	240	247.8	1.032
2	141	210	217.1	1.034
3	112	180	180.9	1.005
Promedio				1.024 ± 0.0163

(Observaciones: La cantidad de planta consumida se refiere al peso de la planta recién cosechada. El animal N° 1 fue sacrificado cuando aparecieron los primeros signos. Los animales N° 2 y 3 continúan actualmente dentro del diseño experimental sin ser sacrificados para correlacionar la mayor cantidad de planta suministrada con la evolución del cuadro y el grado de degeneración cerebelosa)

Tabla 2: Histología cuantitativa de la corteza cerebelosa en bovinos intoxicados natural (IN) y experimentalmente (IE) comparados con un animal testigo.

N° de células de Purkinje/campo	IN		IE		Testigo	
	N° campos	(%)	N° campos	(%)	N° campos	(%)
0 a 2	446	(89.2)	162	(32.4)	160	(32)
3 a 4	49	(9.8)	250	(50)	210	(42)
5 a 11	5	(1)	88	(17.6)	130	(26)



Tabla 3: Histología cuantitativa de la sustancia blanca del cerebelo en bovinos intoxicados natural (IN) y experimentalmente (IE) comparados con un animal testigo.

Nº EA/campo	IN		IE	
	Nº campos	(%)	Nº campos	(%)
0 a 2	447	(89.4)	412	(82.4)
3 a 7	53	(10.6)	88	(17.6)

ii. Con relación a la presencia de esferoides axonales por campo en la sustancia blanca (EA/campo), se constató que la mediana en ambos animales intoxicados (IN y IE) fue de 1 EA/campo, mientras que no se detectaron esferoides en el animal testigo. La categorización por nº de EA/campo se muestra en la Tabla 3.

Los estudios de ME se centraron en la corteza y la sustancia blanca cerebelosa. La corteza cerebelosa de los animales con síntomas severos presentó pocas células de Purkinje reconocibles en los cortes semifinos y sus mitocondrias aparecían tumefactas con cuerpos electrondensos en su interior. Dentro de la sustancia blanca se encontraron axones dilatados con un contenido vesicular (esferoides), algunos de ellos con la pérdida de su envoltura mielínica. En el interior de estos esferoides se encontraron mitocondrias y un gran número de vesículas electrondensas (Fig. 6).

DISCUSIÓN

Los signos clínicos y las lesiones cerebelosas halladas en este síndrome bovino que ocurre en el litoral del Uruguay fueron muy similares a las descritas por otros autores con otras especies de solanáceas^{1,3,4,5}. La reproducción experimental de los signos clínicos y los hallazgos patológicos demostraron de manera concluyente la etiología de esta enfermedad. Los estudios experimentales confirmaron que los animales debieron consumir grandes cantidades de la planta antes de manifestar signos clínicos. De acuerdo con nuestros datos de campo y la opinión de los productores consultados, el consumo de la planta se mantiene incluso en épocas de abundancia de forraje a diferencia de lo reportado con otras solanáceas⁵. El consumo de *S. b.* no fue ocasionado por sobrepastoreo. Nuestros resultados en cuanto a un menor número de células de Purkinje en el caso de intoxicación natural (síntomas severos) frente a lo hallado en el animal intoxicado experimentalmente (inicio de síntomas) coinciden con los reportados por otros autores⁵, aunque en ambos animales (intoxicación natural y experimental) se encontraron gran número de esferoides axonales en la sustancia blanca cerebelosa. El patrón histopatológico descripto coincidió con el reportado por otros autores^{1,3,4,5}, tanto en el daño específico de la célula de Purkinje como en la presencia de esferoides axonales en la sustancia blanca. Las lesiones halladas en las células de Purkinje, indicaron una lesión irreversible de dicha célula (tumefacción celular, tumefacción mitocondrial con cuerpos electrondensos en su interior). En el animal intoxicado experimentalmente, la presencia de

esferoides axonales, sin una disminución significativa del número de células de Purkinje y con signos leves de enfermedad cerebelosa, nos indujo a pensar que esta alteración del axón representaría una etapa inicial en la evolución de esta enfermedad; siendo la desaparición de las células de Purkinje una etapa posterior de la misma. Esta secuencia de daño celular nos llevó a formular la hipótesis de que el daño primario podría deberse a la alteración de la síntesis de elementos del citoesqueleto o de otras proteínas específicas asociadas a éste en la célula de Purkinje, modificando así el tráfico de vesículas y mitocondrias. El resultado sería la acumulación de estos organelos en los axones de las células afectadas. Esta hipótesis coincide con lo planteado por otros autores en procesos de degeneración ascendente de axones sin evidencias claras de lesión del soma. En el sistema nervioso, en células de axones largos -como lo son las células de Purkinje-, algunas injurias neuronales que afectan principalmente el pericario pueden traer como consecuencia una lesión en la porción distal del axón, que se expande en dirección al cuerpo neuronal. Esto ocurre debido a que estos axones dependen para su mantenimiento de las proteínas sintetizadas en el soma y que son transportadas en dirección anterograda hacia la periferia. Estos procesos son frecuentes en intoxicaciones crónicas, principalmente en humanos⁶. Otros autores sugieren que podría ser una enfermedad de almacenamiento lisosomal, probablemente un tipo de gangliosidosis dada la gran similitud entre las alteraciones patológicas halladas en este tipo de intoxicaciones y el de las enfermedades de almacenamiento lisosomal descritas en otras intoxicaciones por plantas. Los mismos autores plantean la gran especificidad sobre la célula de Purkinje que presenta la intoxicación ocasionada por estas solanáceas, siendo esta una diferencia importante con los otros tipos de gangliosidosis ocasionadas por plantas^{2,5,6}. En el futuro, se deberán abordar estudios complementarios de inmunohistoquímica, lectinohistoquímica, identificación del/los principio/s activo/s, estudios "in vivo" e "in vitro" de unión de la/s sustancia/s responsable/s a estructuras específicas de la célula de Purkinje que puedan confirmar o rebatir las hipótesis planteadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CIDEA (Fac. Vet., UdelaR), CSIC (UdelaR). Al Dr. N. Duclós (h), a la Lic. A. Román (Técnica en Microscopía Electrónica, USC) y a la Flia. Morixe (Establecimientos Asencio y San Juan de Asencio) por su gentil colaboración con este trabajo

SUMMARY

A bovine cerebellar disorder of periodic seizures characterized by loss of equilibrium, head and thoracic limbs extension, opisthotonus, nystagmus and falling to the side or backward caused by natural ingestion or ruminal cannula administration of *Solanum bonariensis* is described. The main pathological features were

**X Congreso Latinoamericano de Buiatría
XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría**

vacuolation, degeneration and loss of Purkinje cells with axonal spheroids in cerebellar granular layer and white matter. Quantitative histological analysis confirmed a decrease in the amount of Purkinje cells in naturally poisoned, and a significant presence of axonal spheroids in both natural and experimentally intoxicated bovines. Our results suggested a lesional sequence that could start with axonal spheroids appearance in cerebellar white matter (mild disease), and could finish with Purkinje cells layer disappearance in cerebellar cortex (severe disease). The pathological evolution proposed suggests a modification in the synthesis of cytoskeletal elements (or others cytoskeleton associated proteins) that could determine a mitochondrial and vesicular traffic disruption. We suggest that mitochondrial and vesicular traffic alteration induced by the intoxication may lead the body cell damage found in severe stages of the cerebellar disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Bourke CA Aust. Vet. J. (1997) 5:363-365.
2. de Barros SS, Riet-Correa F, Andujar MB, Lombardo de Barros CS, Méndez MC, and Schild AL. Pesquisa Veterinaria Brasileira (1987) 7:1-5.
3. Menzies JS, Bridges CH, and Bailey EM. The South Western Veterinarian (1979) 32:45-49.
4. Pienaar JG, Kellerman TS, Basson PA, Jenkins WL, Vahrmeijer J, Onderspoort J. Vet. Res. (1976) 43:67-74.
5. Riet-Correa F, Mendez MC, Schild AL, Summers BA, and Oliveira JA. Cornell Vet. (1983) 73:240-256.
6. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A (1995) en: Veterinary Neuropathology, Mosby - Year Book, Inc. St. Louis, 527p.

1



2

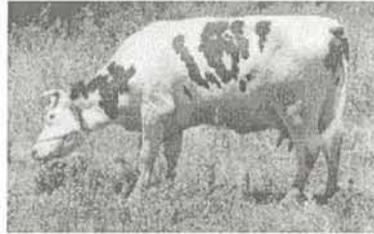


Figura 1. *Solanum bonariensis* ("naranjillo").

Figura 2. Vaca con típica inclinación de cabeza y aumento de base de sustentación.

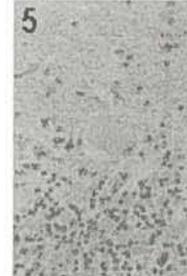
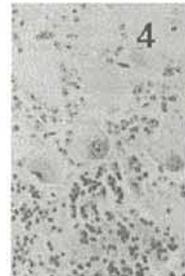


Figura 3. Disminución del número de células de Purkinje en la corteza cerebelosa en animal intoxicado naturalmente (azul de toluidina) X200.

Figura 4. Células de Purkinje pálidas con fina vacuolización en su citoplasma en animal intoxicado naturalmente (azul de toluidina) X400.

Figura 5. Célula de Purkinje vacuolada con núcleo excéntrico en animal intoxicado naturalmente (HE) X400.



Figura 6. A. Esferoides axonales en la sustancia blanca (flechas negras) y microcavitaciones (estrella negra) en animal intoxicado naturalmente (HE) X400. B. Esferoides axonales en la sustancia blanca (flechas negras) en animal intoxicado experimentalmente (ME) X2000.