



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CALCINOSIS ENZOÓTICA EN OVINOS POR
Nierembergia veitchii y *Nierembergia rivularis*

MIZAEEL MACHADO DA COSTA, MV, MSc

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CALCINOSIS ENZOÓTICA EN OVINOS POR
Nierembergia veitchii y *Nierembergia rivularis*

MIZAEL MACHADO DA COSTA, MV, MSc

Dr. Franklin Riet-Correa
Director de Tesis

Dr. Severo Sales de Barros
Codirector de Tesis

2021

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL
DE DEFENSA DE TESIS**

**Dra. Maria Cecilia Cajarville Sanz
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

**Dr. Rodolfo Carlos Rivero García
Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel C. Rubino”
Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca - Uruguay**

**Dr. Fernando Dutra Quintela
Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel C. Rubino”
Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca - Uruguay**

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



Unidad de Posgrados -Oficina de Posgrados-

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 11 de marzo de 2021

Tribunal: Dra. Cecilia Cajarville (Presidente), Dr. Rodolfo Rivero, Dr. Fernando Dutra

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
6433866 - 7	MACHADO DA COSTA, Mizael	6	BBB

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

FIRMA

Dra. Cecilia Cajarville (Presidente)

Dr. Rodolfo Rivero



Dr. Fernando Dutra



NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. – 6 o S.S.S. – 12

“Phantasie ist wichtiger als wissen, denn wissen ist begrenzt”

"La imaginación es más importante que el conocimiento, porque el conocimiento es limitado"

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, agradezco al “Gran Arquitecto del Universo”, el Dios todo poderoso, que me guio, me protegió, y me dio fuerzas para lograr este título. Fueron largos los caminos recorridos en estos diez años.

Este trabajo se hizo posible por el empeño de dos Mentores, con los cuales tuve el honor de convivir. No se puede contar la historia de la calcinosis enzoótica en Sudamérica y ahora en el mundo, sin hablar de ellos.

A mi tutor, Dr. Franklin Riet-Correa, gratitud por la oportunidad, por recibirme en el Uruguay, y por ser un gran ejemplo de profesional y de persona. ¡Que honor trabajar con vos, muchas gracias, Mestre!

A mi cotutor, idealizador del proyecto de doctorado, la leyenda Dr. Severo Sales de Barros. Qué mismo jubilado sigue formando gente. Convivir contigo, aprender la filosofía de trabajo que influyó el éxito de generaciones de patólogos, fue el honor de mi vida. ¡Gratitud eterna, Mestre!

Deseo que la filosofía de trabajo que ustedes enseñaron por décadas sobreviva a el poder del tiempo por medio de sus discípulos. Toda mi admiración y respeto.

Al Dr. Eduardo Juan Gimeno (Universidad Nacional de La Plata-Argentina), mismo jubilado, aceptó de pronto el desafío de llevar a cabo el trabajo de revisión. ¡Muchas gracias!

Agradezco al Dr. Márcio Botelho de Castro, Dra. Tais Meziara Wilson y Dra. Alexandra Bittencourt del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad de Brasilia, por la ejecución de la técnica de inmunohistoquímica.

A mi familia por el apoyo en todos los momentos y a la querida Cintia Queiroz que me ayudó activamente, pero de forma anónima, para lograr llevar a cabo la tesis de doctorado.

A todos los compañeros que me hicieron los días más alegres en Uruguay: Anita, Carlos, Fabiana, Luiz, Luis, Gracialda, Luciana, Ana Carolina, Juan Pablo y los estudiantes del practicantado.

A INIA por la financiación de la beca doctoral y a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por el apoyo y oportunidad.

Gracias Uruguay, por la naturaleza y por la gente. Disfruté cada salida al campo, cada necropsia y las múltiples enfermedades de rumiantes y plantas tóxicas que solo había escuchado o mirado en libros.

“Renunciar...ya lo pensé, pero nunca me tomé en serio; es que hay más camino en mis ojos que fatiga en mis piernas, más esperanza en mis pasos, que tristeza en mis hombros, más camino en mi corazón que miedo en mi cabeza”.

“Desistir...eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

ÍNDICE

RESUMEN	ix
SUMMARY.....	x
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	xi
2. HIPÓTESIS.....	xii
3. OBJETIVO GENERAL.....	xii
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	xii
5. ESTRATÉGIA DE LA INVESTIGACIÓN	xiii
6. CAPÍTULO 1. CALCINOSIS ENZOÓTICA EN RUMIANTES: REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
7. CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LA INTOXICACIÓN POR <i>Nierembergia veitchii</i> SOBRE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS ARTERIALES: UNA CONTRIBUCIÓN A LA PATOGENIA DE LA CALCINOSIS ENZOÓTICA.....	17
8. CAPÍTULO 3. CALCINOSIS ENZOÓTICA EN OVINOS EN URUGUAY.....	32
9. CAPÍTULO 4. HIPERPLASIA Y CARCINOMA DE CÉLULAS PARAFOLICULARES EN OVINO INTOXICADO POR <i>Nierembergia rivularis</i>	42
10. CONCLUSIONES GENERALES.....	47
11. REFERENCIAS.....	48
12. ANEXO 1.....	56

RESUMEN

La calcinosis enzoótica es una enfermedad caracterizada por curso crónico, mineralización de tejidos blandos, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipercalcitoninismo, hipoparatiroidismo, osteonecrosis y osteopetrosis. El objetivo de esta tesis fue aportar nuevas informaciones al mecanismo patogénico de la calcinosis enzoótica a partir de casos de intoxicación por *Nierembergia veitchii* en ovinos y caracterizar regionalmente la ocurrencia de la intoxicación por *Nierembergia rivularis* en ovinos en Uruguay. El proceso de calcificación arterial en la calcinosis enzoótica presenta características comunes al proceso de osificación. Detectamos la expresión de proteínas estimuladoras del proceso de calcificación, cambios morfológicos de las células musculares lisas arteriales, eventos de migración, y producción de vesículas matriciales y exosomas que son indispensables para el inicio del dicho evento. En conclusión, son necesarias condiciones bioquímicas y celulares adecuadas para el desarrollo del proceso de calcificación. Los resultados inmunohistoquímicos y ultraestructurales encontrados en ovinos intoxicados con *N. veitchii* pueden ser aplicados al mecanismo patogénico de otras plantas calcinogénicas. En Uruguay, la intoxicación por *N. rivularis* es actualmente la principal causa de calcinosis enzoótica y afecta principalmente a los ovinos en las épocas de primavera y verano. Los brotes están asociados a áreas húmedas del lago del Rincón del Bonete en los departamentos de Tacuarembó y Durazno. Las tasas de mortalidad varían de 5% a 24%. Son afectados ovinos de todas las edades, excepto lactantes. En un ovino intoxicado por *N. rivularis* fue observado carcinoma de las células C de las tiroides, que puede estar asociada a hipercalcemia crónica.

PALABRAS CLAVE: Calcinosis enzoótica, rumiantes, plantas tóxicas, vitamina D.

SUMMARY

Enzootic calcinosis is a disease characterized by a chronic course, soft tissue mineralization, hypercalcemia, hyperphosphatemia, hypercalcitoninism, hypoparathyroidism, osteonecrosis, and osteopetrosis. The purpose of this thesis was to provide new information on the pathogenic mechanism of enzootic calcinosis from cases of poisoning by *Nierembergia veitchii* in sheep and to characterize the occurrence of poisoning by *Nierembergia rivularis* in sheep in Uruguay. The process of arterial calcification in enzootic calcinosis has characteristics in common with the process of ossification. We detected the expression of stimulatory proteins of the calcification process, morphological changes in vascular smooth muscle cells, migration events, and production of matrix vesicles and exosomes that are crucial for the initiation of this event. In conclusion, favorable biochemical and cellular conditions are necessary for the development of the calcification process. The immunohistochemical and ultrastructural results found in sheep poisoned by *N. veitchii* can be applied to the pathogenic mechanism of other calcinogenic plants. In Uruguay, *N. rivularis* poisoning is currently the main cause of enzootic calcinosis and mainly affects sheep during spring and summer. The outbreaks are associated with humid areas of the Rincón del Bonete lake in the departments of Tacuarembó and Durazno. Mortality rates vary from 5% to 24%. Sheep of all ages are affected, except lactating animals. Malignant transformation of thyroid C cells, is reported in a sheep poisoned by *N. rivularis* and could be associated with chronic hypercalcemia.

KEYWORDS: Enzootic calcinosis, ruminants, poisonous plants, vitamin D.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La calcinosis enzoótica es una enfermedad crónica, descrita en todos los continentes, que afecta principalmente a los rumiantes asociada con el consumo de varias plantas calcinogénicas. El cuadro clínico, la epidemiología, las alteraciones macro y microscópicas son bien conocidos en la mayoría de los países; sin embargo, la comprensión del mecanismo patogénico de esta enfermedad sigue siendo un desafío.

Las pérdidas económicas siguen ocurriendo en áreas invadidas por plantas calcinogénicas, como en el caso del Uruguay. Por tratarse de una enfermedad que no tiene tratamiento efectivo, la caracterización etiológica y epidemiológica de la enfermedad es importante para que los productores y médicos veterinarios puedan identificar y adoptar medidas de control y profilaxis para rebaños criados en áreas endémicas.

2. HIPÓTESIS

- Las proteínas óseas no colágenas, la fosfatasa alcalina no tejido específica, las vesículas matriciales y los exosomas están involucrados en el proceso de calcificación de las arterias, en la calcinosis enzoótica.
- En Uruguay, la intoxicación por *Nierembergia rivularis* es la principal causa de calcinosis enzoótica y afecta principalmente a los ovinos criados en zonas húmedas.
- La hipercalcemia crónica secundaria a la intoxicación por planta calcinogénica puede generar alteración preneoplásica (hiperplasia) y transformaciones malignas (carcinoma) de la tiroides.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo patogénico de la calcinosis enzoótica utilizando casos de intoxicación en ovinos por *Nierembergia veitchii* y caracterizar la calcinosis enzoótica causada por *Nierembergia rivularis* en ovinos en Uruguay.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar la expresión de las proteínas óseas no colágenas, fosfatasa alcalina no tejido específica y caracterizar las alteraciones ultraestructurales involucradas en el proceso de mineralización arterial en la calcinosis enzoótica.
- Caracterizar los aspectos etiológicos, epidemiológicos, clínicos y patológicos y las medidas de control y profilaxis de la calcinosis enzoótica en ovinos en Uruguay.
- Reportar un caso de hiperplasia y carcinoma de células C de la tiroides en una oveja intoxicada por *Nierembergia rivularis*.

5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

La presente tesis consta de cuatro artículos que fueron realizados con el fin de cumplir con los objetivos planteados anteriormente. En el artículo uno, se realizó una revisión de la calcinosis enzoótica en el mundo, con el objetivo de aportar datos relacionados a la historia de la enfermedad, especies y características morfológicas de las plantas calcinogénicas, principio tóxico, patogénesis, epidemiología, signos clínicos, patología, diagnóstico, control y profilaxis de la misma. Este artículo fue publicado en la revista *Toxicon* (10.1016/j.toxicon.2020.08.009). En el artículo dos, presentamos una contribución al entendimiento del mecanismo patogénico de la calcinosis enzoótica. El trabajo será enviado para revista *Veterinary Pathology*. En el artículo tres, presentamos una revisión de literatura a cerca de la calcinosis enzoótica en ovinos en Uruguay y describimos dos brotes de intoxicación por *Nierembergia rivularis* en esta especie. Este artículo fue publicado en la revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* (10.1590/1678-5150-PVB-6766). Por fin, en el artículo cuatro describimos los aspectos patológicos de un caso de hiperplasia y carcinoma de células C de la tiroides en una oveja con calcinosis enzoótica, que fue publicado en la revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* (10.1590/1678-4162-11795).

6. CAPÍTULO 1. CALCINOSIS ENZOÓTICA EN RUMIANTES: REVISIÓN DE LITERATURA

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.009>

RESUMEN

La calcinosis enzoótica (CE), es una enfermedad crónica, causada por plantas tóxicas, que ha afectado principalmente a los rumiantes durante más de 100 años. Se caracteriza por una calcificación de los tejidos blandos, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipoparatiroidismo, hipercalcitoninismo, osteonecrosis y osteopetrosis. El compuesto tóxico reportado en algunas de estas plantas son $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y sus metabolitos. La caracterización de esos principios calcinogénicos se realizó en *Solanum glaucophyllum*, *Trisetum flavescens*, *Cestrum diurnum* y *Stenotaphrum secundatum*. Otras especies de plantas que causan CE son *Nierembergia rivularis*, *Nierembergia veitchii*, *Solanum torvum*, y *Solanum stuckertii*. Los hallazgos clínicos y patológicos de la CE están bien caracterizados. En esta tesis presentamos diferentes aspectos del mecanismo patogénico de la CE, incluyendo la modulación genética, la expresión de las proteínas óseas, la desdiferenciación celular de las células musculares lisas arteriales, los cambios fenotípicos, la producción de una matriz calcificable y la modulación del equilibrio de calcio y fósforo. El uso de la patología comparativa puede aportar avances significativos en la comprensión del mecanismo patogénico. Presentamos, además, un enfoque amplio de los diferentes aspectos de la intoxicación: historia de la CE en diferentes continentes; especies de plantas causadoras, su distribución y morfología; principio tóxico; patogénesis; epidemiología; signos clínicos; diagnóstico; y control y profilaxis.

Palabras clave: calcinosis enzoótica, plantas calcinogénicas, patogénesis, vitamina D.

INTRODUCCIÓN

La calcinosis enzoótica (CE) sigue siendo un problema importante en la producción de rumiantes en zonas geográficas específicas de todos los continentes, a pesar de los avances científicos. En los rumiantes, la CE es una enfermedad crónica, compleja, causada por plantas tóxicas, y caracterizada por calcificación de tejidos blandos, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipoparatiroidismo, hipercalcitoninismo, osteonecrosis y osteopetrosis (Riet-Correa et al. 1987; Mello, 2003).

Se ha reportado calcinosis enzoótica en animales de producción en las Américas (Sivori, 1896; Lignières, 1898; Collier, 1926; Pardi & Santos, 1947; Barros et al. 1970; Krook et al. 1975a, Krook 1975b; Riet-Correa et al. 1975, Riet-Correa et al. 1987; Carrillo & Worker, 1967; Arnold & Fincham, 1997; Durand et al. 1999; García y Santos et al. 2012; Odriozola et al. 2017), Europa (Libiseller & Gunhold, 1969; Köhler, 1981; Dirksen et al. 1970; Wanner et al. 1986), África (Tustin et al. 1973), Asia (Neumann et al. 1973), y Oceanía (Copland, 1975; Morris et al. 1979).

El 1,25(OH)₂D₃ ha sido identificado como el principio tóxico en plantas calcinogénicas conocidas: *Solanum glaucophyllum* Desf. (anteriormente *Solanum malacoxylon* Sendtn), *Trisetum flavescens* (L.) P. Beauv., *Cestrum diurnum* L., y *Stenotaphrum secundatum* Kuntze (Jäpelt & Jakobsen, 2013).

Los casos esporádicos o los brotes de intoxicación son endémicos (enzoóticos) en zonas con plantas calcinogénicas (Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009). El consumo natural y experimental de *Solanum glaucophyllum*, *Trisetum flavescens*, *Cestrum diurnum* y *Solanum torvum* Buch. Jamón. ex Wall, *Nierembergia veitchii* Berk. ex Hook, y *Nierembergia rivularis* Miers. (sinónimo *Nierembergia repens* Ruiz & Pav) en varias especies animales, pero principalmente en rumiantes, causa enfermedades crónicas caracterizadas por elevación de los niveles séricos de calcio y fósforo y mineralización de tejidos blandos (calcinosis) que afecta al sistema cardiovascular, incluyendo las arterias elásticas y musculares, pulmones, riñones, tendones, pre-estómagos, útero y huesos (Morris, 1982; Moraña et al. 1994; Mello, 2003; García y Santos et al. 2012).

En algunos países se han notificado enfermedades similares de mineralización sistémica con etiologías desconocidas en animales de pastoreo, que posiblemente estén relacionadas con la ingestión de plantas tóxicas aún no identificadas (Hendershot, 1942; Lynd et al. 1965; Neumann et al. 1973; Tustin et al. 1973; Gill et al. 1976; et al. 2011; Collett & Brown, 2018).

La elucidación del mecanismo patogénico de la CE sigue siendo un desafío. Durante años, la calcificación metastásica debida a la hipercalcemia fue el mecanismo primario propuesto para la CE (Carrillo & Worker, 1967; Riet-Correa et al. 1975; Hilbe et al. 2000; Holcombe et al. 2014; Miller & Zachary, 2017). Sin embargo, se han propuestos nuevas teorías y mecanismos relativos a la patogénesis de la CE basados en las investigaciones de microscopía electrónica de transmisión e inmunohistoquímica de tejidos lesionados (Barros et al. 1981; Vasconcelos et al. 1998; Barros & Gimeno, 2000; Peixoto et al. 2012).

El presente capítulo tiene por objetivo ofrecer una visión detallada de la CE, abordando la historia de la enfermedad en todo el mundo, las características de las plantas calcinogénicas y los principios tóxicos, la patogénesis, los aspectos clínico-patológicos y la prevención.

HISTORIA DE LA CALCINOSIS ENZOÓTICA EN EL MUNDO

La CE se identificó por primera vez en bovinos con calcificación pulmonar en el siglo XIX en Argentina (Sivori, 1896). La enfermedad se denominó regionalmente "enteque seco" (Ligniérés, 1898), con una etiología que se creía estar relacionada con la pasteurelisis crónica. También se detectó en Argentina "arteriosclerosis epidémica" en ovinos, enfermedad similar al enteque seco (Ligniérés, 1912). Durante el verano se identificó una enfermedad en las zonas inundadas con presencia de *Solanum*

glaucophyllum nativo. Se asoció la enfermedad con la ingesta de la planta y se reportaron cambios patológicos y métodos de control (Collier, 1926, 1927).

En Brasil se describió por primera vez la CE en bovinos con mineralización pulmonar y arterial en el Pantanal del Mato Grosso, la región inundable tropical más extensa del mundo (Tibiricá, 1927a, b; Pardi & Santos, 1947). En la misma región, un estudio detallado evaluó la intoxicación de bovinos por *Solanum glaucophyllum* (el nombre regional de la planta es "espichadeira" y el de la enfermedad "espichamento") y su impacto económico (Döbereiner et al. 1971). También se reportó calcinosis enzoótica en ovinos en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Barros et al. 1970), atribuida al consumo de *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1987).

En Jamaica desde la década de 1940, una enfermedad conocida como "Manchester Wasting Disease", que causa calcificación pulmonar y cardiovascular en bovinos, cabras y caballos, inicialmente se atribuyó a un desequilibrio nutricional (Arnold & Fincham, 1950). Posteriormente, un estudio experimental que investigó la interacción de calcio, fósforo y magnesio sugirió que una planta era la fuente de vitamina D y la etiología de la enfermedad (Arnold, 1969). Más tarde, *Stenotaphrum secundatum*, que también contiene $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, fue identificado como la causa de la CE en Jamaica, todavía no se ha reproducido experimentalmente la enfermedad con esa planta. Sin embargo, la enfermedad tiene menor impacto actualmente debido a la sustitución de las zonas naturales de *Stenotaphrum secundatum* por pastos más productivos (Arnold & Fincham, 1997). Se ha descrito una enfermedad calcinogénica en bovinos y caballos, causada por la planta *Cestrum diurnum*, abundante en pastos en Miami (Florida, EEUA) (Krook et al. 1975a; Krook et al. 1975b; Wasserman et al. 1975). El *Cestrum diurnum* es también una causa importante de CE en bovinos en Cuba (Durand et al. 1999).

En Austria, se notificó una CE en bovinos asociada inicialmente a un desequilibrio mineral (Onderscheka et al. 1967; Libiseller & Gunhold, 1969). Se propuso como causa de la enfermedad un compuesto tóxico en los pastizales y no se detectó desequilibrio mineral (Köhler & Libiseller, 1970). Intoxicación experimental de conejos con *Trisetum flavescens* (Poaceae) llevó a la determinación de la etiología de la enfermedad (Dirksen et al. 1971; Dirksen et al. 1972).

En las zonas silvopastoriles de pinos en Papúa Nueva Guinea, se identificó una enfermedad caracterizada por mineralización sistémica, altos niveles séricos de calcio y fósforo, y signos clínicos de CE principalmente en bovinos destetados (Copland, 1975). Intoxicación experimental de ratas con hojas de *Solanum torvum* produjo mineralización de tejidos blandos, hipercalcemia e hiperfosfatemia (Morris et al. 1979).

En Uruguay la CE está asociada al consumo de *Solanum glaucophyllum* y *Nierembergia rivularis* y afecta bovinos y ovinos creados en zonas húmedas (Riet-Correa et al. 1975; García y Santos et al., 2012).

También se ha descrito CE en cabras adultas en pastoreo semi extensivo desde 2007 en San Luis, Argentina (Iglesias et al. 2008). Recientemente, se determinó que la enfermedad es causada por intoxicación natural por *Solanum stuckertii* (Rossanigo et al. 2017).

Calcinosis enzoótica causada por plantas tóxicas aún no identificadas ocurre en rumiantes en Hawaii (Hendershot, 1942; Lynd et al. 1965), Israel (Neumann et al. 1973), Sudáfrica (Tustin et al. 1973), India (Gill et al. 1976), Brasil Central (Guedes et al. 2011) y Nueva Zelandia (Collett & Brown, 2018).

Teniendo en cuenta el desarrollo actual de métodos analíticos para estudiar la vitamina D y sus compuestos conexos (Jäpelt & Jakobsen, 2013), se espera que en un futuro próximo esta tecnología permita determinar los compuestos tóxicos aún desconocidos de algunas plantas calcinogénicas y estudiar otras calcinosis enzoóticas de causa desconocida.

ESPECIES, DISTRIBUCIÓN Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS PLANTAS CALCINOGENICAS

Dos familias de plantas tóxicas están asociadas con la CE, *Trisetum flavescens* y *Stenotaphrum secundatum*, de la familia Poaceae, y *Cestrum diurnum*, *Nierembergia rivularis*, *Nierembergia veitchii*, *Solanum glaucophyllum*, *Solanum stuckertii* y *Solanum torvum* de la familia Solanaceae.

Solanum glaucophyllum (Figura 1) se encuentra en Argentina, Uruguay, en los suelos arcillosos del Pantanal brasileño de los estados de Mato Grosso y Mato Grosso do Sul, y en el sur del estado de Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al. 1975; Gimeno, 2001; Tokarnia et al. 2012). Es un arbusto caducifolio que crece hasta 1,5 m de altura y está compuesto por hojas simples y lanceoladas de hasta 20 cm de longitud, y crecimiento activo en verano. La inflorescencia primaria es terminal y las demás son laterales; las flores son violáceas, la fruta es redonda y negra, y las raíces son profundas y rizomatosas (Okada et al. 1977).

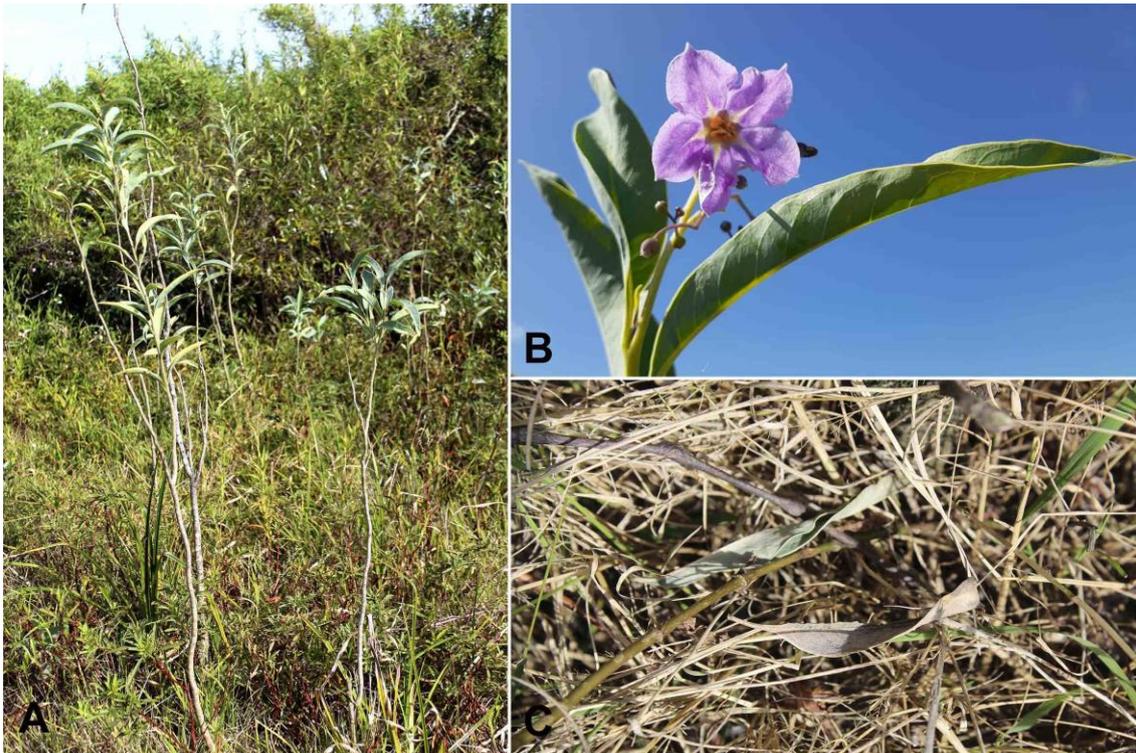


Figura 1. Plantas tóxicas calcinogénicas. **A)** *Solanum glaucophyllum*. **B)** Inflorescencia. **C)** Los animales consumen las hojas caídas mezcladas con el pasto.

En la provincia de San Luis, Sur de los Andes, Argentina, *Solanum stuckertii* que crece en campos abiertos y próxima a áreas inundadas causa CE en caprinos. La planta es un arbusto de hasta 3 metros de altura, con el tallo cubierto de pelos finos, flores amarillentas y blancas y frutas globosas, que cuando están maduras exhiben una coloración naranja (Rossanigo et al. 2017).

Trisetum flavescens es una planta perenne, con una altura de 20-130 cm, con tallos erectos, sin ramas y con nudos marrones. Las hojas son lanceoladas, de hasta 18 cm de longitud y de 1 a 4 mm de ancho y de color verde, con pelos. Las panículas son doradas, densas, estrechas y erguidas de hasta 17 cm de largo, mientras que los granos son estrechos de 1 a 3 mm de longitud y el sistema de la raíz inferior es ramificado y rizomatoso (Dixon, 1995).

En la mayor parte de Europa el *Trisetum flavescens* crece en condiciones diversas, incluyendo suelos secos y neutros con sustrato de caliza a magnesio y devoniano. Es adaptada a temperaturas entre -40 °C y 40 °C, y precipitaciones anuales de 1 a 1900 mm. CE asociada a *Trisetum flavescens* se identificó en rumiantes en Austria, Alemania y Suiza (Dirksen et al. 1971).

Cestrum diurnum es un arbusto o un árbol pequeño y perenne, de hasta 2 m de altura, nativo de Cuba, Jamaica y Puerto Rico. La planta está adaptada a suelos poco profundos con un crecimiento activo en áreas no sombreadas, con 1400-2400 mm de precipitación. Fue introducida como planta ornamental en Norteamérica. Se caracteriza por

tallos erectos, hojas lanceoladas de 5-11 cm de longitud, flores amarillentas-blancas y frutos de color violeta a negro (Durand et al. 1999). En Florida, esta planta invade y crece en exceso en zonas degradadas causando CE en rumiantes y caballos (Krook et al. 1975a; Krook et al. 1975b).

Nierembergia spp. son plantas rastreras con tallos delgados, hojas simples y redondeadas de color verde, 2-3,5 cm de ancho y 1-1,5 cm de largo, y pueden ser glabras o pubescentes, mientras que las flores son blancas. *Nierembergia veitchii* (Figura 2A) es una planta tóxica calcinogénica para las ovejas y, raramente, para bovinos en Río Grande do Sul, Brasil. Se encuentra en suelos de las zonas rurales altas de los municipios de Júlio de Castilhos, Tupanciretã, Santa Lúcia, São Sepé, Piratini, Pinheiro Machado y Lavras do Sul (Barros et al. 1970; Riet-Correa et al. 1987). *Nierembergia rivularis* (Figura 2B) es una planta tóxica para ovinos encontrada en Sudamérica, principalmente en zonas húmedas de Uruguay cerca de ríos y lagos (García y Santos et al. 2012).



Figura 2. Plantas tóxicas calcinogénicas. **A)** *Nierembergia veitchii*. **B)** *Nierembergia rivularis*.

En Jamaica, *Stenotaphrum secundatum* es una planta de crecimiento constante que forma alfombras de hojas que causan la CE, y se encuentra en suelos húmedos en regiones tropicales o subtropicales. Los tallos tienen una longitud de 10-30 cm, con hojas conduplicadas, lígulas y borde piloso (Arnold y Fincham, 1997).

PRINCIPIO TÓXICO Y PATOGENIA

La vitamina D es un secosteroide clasificado en cinco clases diferentes y dos formas primarias: vitamina D₂ (ergocalciferol) y vitamina D₃ (colecalfiferol) (Jäpelt & Jakobsen, 2013). La síntesis de vitamina D₃ se produce a través de la conversión fotoquímica del 7-dehidrocolesterol de provitamina inducido por rayos ultravioleta (UVB) (longitud de onda, 290 nm-315 nm). Se transforma en 25(OH)D₃ mediante la acción de 25-

hidroxilasa en el hígado y, en el riñón, se convierte en la forma activa $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol), mediante la acción de 1α -hidroxilasa.

El calcitriol induce la síntesis de las proteínas complejantes del calcio, que son responsables por la absorción del calcio en el intestino. Otros efectos fisiológicos de la vitamina D son bien conocidos (Holick et al. 1981; Jäpelt & Jakobsen, 2013).

La hipercalcemia es el resultado de una mayor concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en intoxicaciones endógenas o exógenas. Las principales causas de intoxicación endógena por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ son las enfermedades granulomatosas, los linfomas y la hipercalcemia infantil idiopática, mientras que la intoxicación exógena por vitamina D se debe a la sobredosis de análogos de vitamina D a través de diversas vías de administración (Marcinowska-Suchowierska et al. 2018). El consumo de plantas tóxicas calcinogénicas es la causa más importante de intoxicación exógena por vitamina D entre los animales de pastoreo.

Se encuentran precursores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en plantas de la familia Cucurbitaceae, Fabaceae, Poaceae y Solanaceae (Boland et al. 2003), y en algas en Australia (Hughes et al. 2018). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, un potente principio calcinogénico, se ha notificado en *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens* y *Stenotaphrum secundatum* (Arnold & Fincham, 1997; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Aunque no se caracterizaron químicamente los principios tóxicos de *Nierembergia veitchii*, *Nierembergia rivularis* y *Solanum torvum* estas plantas también muestran actividad biológica similar a la vitamina D (Morris et al. 1979; Riet-Correa et al. 1987; Mello, 2003; García y Santos et al. 2012).

Trisetum flavescens, una planta conocida como tóxica para los rumiantes en Europa, cultivada en ausencia de radiación UVB carece de actividad y toxicidad de la vitamina D. Los rayos UVB son cruciales para la formación de vitamina D en plantas y animales vertebrados (Rambeck et al. 1981).

Las plantas de las familias Solanaceae y Poaceae son sometidas a hidrólisis bacteriana en el tracto digestivo de rumiantes y monogástricos, liberando precursores de vitamina D y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Este último provoca directamente cambios en el metabolismo del calcio y el fósforo en los tejidos blandos y óseos (Figura 3).

Su ingesta se superpone con la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el riñón y estimula la producción de proteínas transportadoras de calcio, la hipercalcemia y la hiperfosfatemia debido a un aumento patológico de la absorción intestinal de calcio y la reabsorción renal de fósforo, respectivamente. La hipercalcemia promueve la retroalimentación negativa de la parathormona y desencadena la secreción de calcitonina de las células C de la tiroides, lo que da lugar al hipercalcitoninismo y al hipoparatiroidismo (Morris, 1982; Mello, 2003).

La mineralización de los tejidos blandos es el resultado de la interacción entre las células de los tejidos, una matriz orgánica y los cristales inorgánicos (es decir, los

minerales). El depósito de minerales en los tejidos puede ser el resultado de procesos fisiológicos o patológicos dentro o fuera de la célula, y en una matriz orgánica (Donnelly & Boskey, 2011). Bajo la acción del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la hidroxiapatita puede depositarse como oxalatos en los vasos sanguíneos, los músculos, los cartílagos hialinos y articulares, y los tejidos blandos (Donnelly & Boskey, 2011).

En la literatura, los mecanismos patológicos de la mineralización que se producen en la CE han sido controvertidos. La calcificación metastásica es ampliamente aceptada para describir la mineralización de los tejidos detectados en animales con hipervitaminosis D (Carrillo & Worker, 1967; Riet-Correa et al. 1975; Hilbe et al. 2000; Holcombe et al. 2014; Miller & Zachary, 2017).

El depósito de las sales de calcio en tejidos sanos o previamente lesionados, también conocido como mineralización patológica, se clasifica tradicionalmente como calcificación metastásica y calcificación distrófica. La calcificación distrófica se produce en tejidos previamente lesionados, mientras que la calcificación metastásica se asocia con la hipercalcemia y el subsiguiente depósito de minerales en los tejidos blandos normales (Miller & Zachary, 2017). De hecho, la hipercalcemia es una alteración metabólica frecuente en respuesta a la acción del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la CE. Por lo tanto, los altos niveles séricos tempranos de calcio seguidos de la deposición de minerales en los tejidos fueron la base para el establecimiento del término patológico "mineralización metastásica" (Morris, 1982). En contraste con la teoría de la calcificación metastásica en la CE, se sugiere que la degeneración y fragmentación de las fibras elásticas vasculares surgen antes de la calcificación tisular en la toxicosis por vitamina D (Done et al. 1976; Peixoto et al. 2012).

Ultraestructuralmente, la degeneración y la necrosis no se detectan en las lesiones arteriales en la CE. Por otra parte, el daño arterial inicial se caracteriza por cambios morfológicos en las células musculares lisas y la mineralización de la matriz extracelular (Vasconcelos et al. 1998) y contrasta con la mineralización intracelular de las células lesionadas vinculada al mecanismo patológico de la calcificación distrófica (Miller & Zachary, 2017).

No se comprenden plenamente los mecanismos patogénicos de la mineralización de los tejidos inducida por las plantas calcinogénicas en los animales domésticos (Norman et al. 1992; Mello, 2003; Norman, 2006; Peixoto et al. 2012; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Se ha propuesto una patogénesis compleja, que comprende la acción directa del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la promoción de efectos genómicos y no genómicos. Los efectos genómicos se desencadenan por medio de receptores intranucleares de vitamina D (RVD) en horas o días, permitiendo la formación de un complejo de receptores de esteroides regulados por la expresión genética de más de 60 genes, y modulando la transcripción de las proteínas reguladas por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Norman et al. 1992; Norman, 2006).

Otros efectos son la desdiferenciación, la proliferación y la migración celular, la metaplasia cartilaginosa y ósea, la producción de una matriz extracelular calcificable y la expresión de proteínas que intervienen inicialmente en los mecanismos fisiológicos de la

mineralización ósea (osteopontina, osteonectina y osteocalcina) (Barros et al. 1970, Barros et al. 1981, Barros et al. 1996, Vasconcelos et al. 1998; Barros et al. 2006; Barros & Gimeno, 2000; Norman, 2006; Durham et al. 2018). Los resultados de las interacciones entre el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y sus receptores nucleares y de membrana en las células musculares lisas arteriales (CMLA) parecen ser la clave para elucidar la patogénesis de la CE.

Los efectos no genómicos se caracterizan por la interacción del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con los RVD en la membrana celular, promoviendo un aumento de la absorción intestinal de calcio, la reabsorción renal de fósforo y la degeneración de los osteoclastos y los osteocitos (Barros et al. 1992; Norman et al. 1992; Norman, 2006).

Las CMLA desempeñan un papel central en la calcificación vascular y muestran una plasticidad fenotípica en respuesta a la toxicosis por la vitamina D y en otras enfermedades en humanos caracterizadas por mineralización vascular (Durham et al. 2018). Un estudio ultraestructural que examinó las arterias de conejos intoxicados por *Solanum glaucophyllum* informó que los cambios fenotípicos en las CMLA están relacionados con la patogénesis de la mineralización arterial y fueron observadas pocas horas después de la ingestión de la planta (Barros et al. 1981).

La desdiferenciación de las CMLA da como resultado propiedades sintéticas y características comunes en los condrocitos, osteoblastos y macrófagos (Durham et al., 2018). Las CMLA sintéticas producen vesículas matriciales, estimulan la desregulación de las moléculas inhibitoras de la calcificación y la síntesis de una matriz extracelular calcificable (Shanahan et al. 2011).

La mineralización patológica de las arterias se ha estudiado ampliamente en los seres humanos, y estudios más recientes han demostrado la complejidad de estos mecanismos (Durham et al. 2018). Las hipótesis propuestas consideran que la expresión genética exagerada se produce debido a un aumento de las concentraciones de metabolitos de vitamina D que se unen a los RVD nucleares (Lim & Thadhani, 2020). Por lo tanto, la simple suposición de la hipercalcemia como causa aislada de mineralización y lesión tisular ya no es satisfactoria para explicar el complejo fenómeno de calcificación en la CE.

A continuación, basándose en la literatura revisada presentamos una propuesta del mecanismo patogénico de la CE (Figura 3).

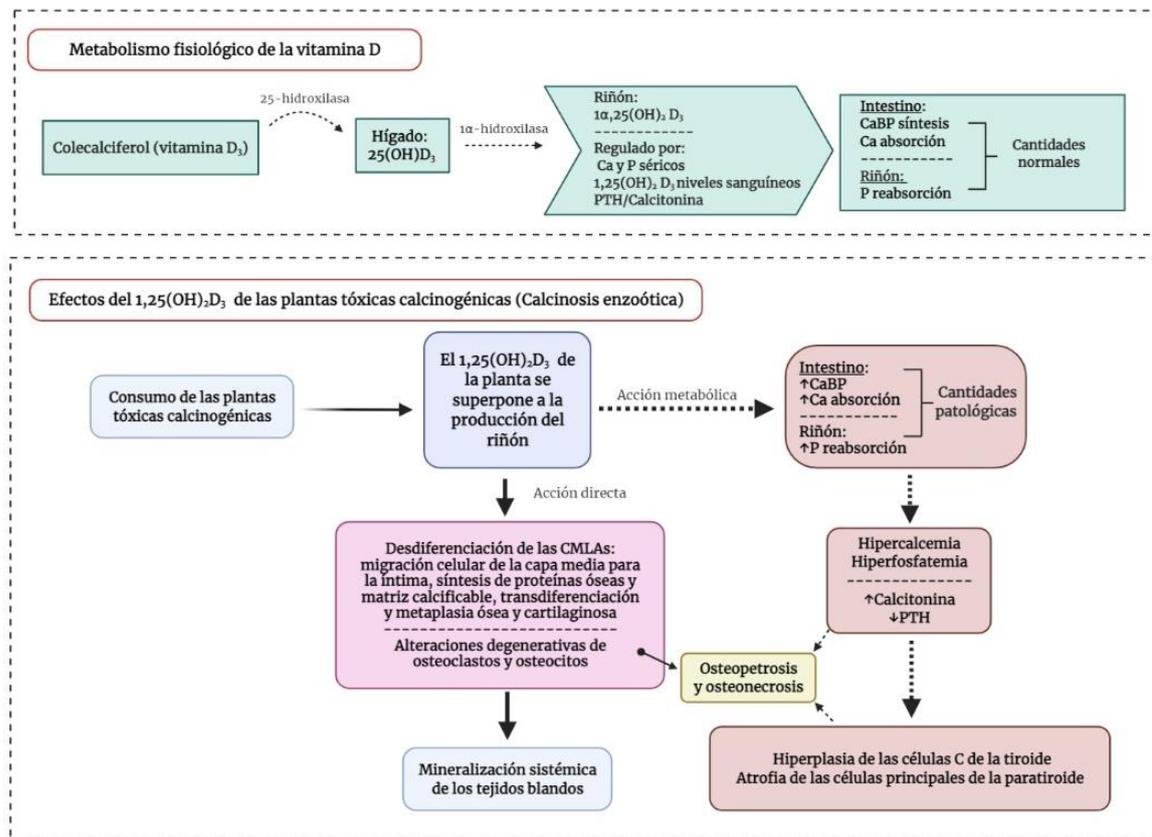


Figura 3. Basándose en la revisión de la literatura, las acciones de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pueden ser divididas didácticamente en acción directa y acción metabólica. La acción metabólica comprende un aumento patológico de la absorción y reabsorción del calcio y del fósforo y el fallo del sistema de regulación endocrina de la función metabólica ósea. La acción directa desarrolla cambios en las células musculares lisas arteriales, lo que conduce a la mineralización sistémica de los tejidos blandos. También genera cambios degenerativos en los osteoclastos y los osteocitos, lo que da lugar a la osteopetrosis y la osteonecrosis.

EPIDEMIOLOGÍA Y SIGNOS CLÍNICOS

Los bovinos son más afectados por la intoxicación por *Solanum glaucophyllum* (Collier, 1926; Döbereiner et al. 1971; Gimeno, 2001); sin embargo, la enfermedad también puede afectar ovinos (Ligniérés, 1912), equinos (Odriozola et al. 2017), búfalos (Santos et al. 2011) y cerdos (Campero & Odriozola, 1990). *Nierembergia veitchii* y *Nierembergia rivularis* afectan los ovinos (Barros et al. 1970; Riet-Correa et al. 1987; Rissi et al. 2007, 2009; García y Santos et al. 2012), pero rara vez se ha notificado CE por *Nierembergia veitchii* en bovinos (Riet-Correa et al. 1987). *Cestrum diurnum* y *Trisetum flavescens* afectan principalmente bovinos (Krook et al. 1975a; Libiseller & Gunhold, 1969; Durand et al. 1999), pero también caprinos (Arnold & Fincham, 1950; Wanner et al. 1986; Durand et al. 1999), y equinos (Krook et al. 1975b; Köhler, 1981). Sólo bovinos fueron intoxicados por *Solanum torvum* (Morris et al. 1979), y sólo caprinos por *Solanum stuckertii* (Rossanigo et al. 2017). En cuanto al *Stenotaphrum secundatum*, los bovinos, ovinos y caprinos son afectados por igual (Arnold & Fincham, 1997).

La edad de los bovinos intoxicados naturalmente por *Solanum glaucophyllum* en el Pantanal oscilaba entre 2 y 9 años (Döbereiner et al. 1971). Las hembras adultas de búfalo intoxicadas por *Solanum glaucophyllum* son más gravemente afectadas que los machos o los animales jóvenes (Santos et al. 2011). De 110 equinos adultos 9% fueron intoxicados por *Solanum glaucophyllum* y 5% murieron (Odriozola et al. 2017).

En las ovejas intoxicadas por *Nierembergia veitchii*, la morbilidad puede oscilar entre el 1% y el 90%, y la mortalidad entre el 1% y el 25%, afectando a animales de todas las edades, excepto corderos lactantes (Riet-Correa et al. 2007). En los brotes de la enfermedad en diferentes propiedades, los ovinos tenían entre 1 y 5 años (Rissi et al. 2007, Rissi et al. 2009). La morbilidad en el ganado vacuno fue del 0,7%. Esta baja tasa se debe probablemente a un menor consumo de plantas porque se trata de una planta rastrera, no arbustiva, que es más fácil de consumir por los ovinos (Riet-Correa et al. 2007). En las zonas invadidas por *Nierembergia veitchii* y *Nierembergia rivularis*, la cantidad de planta en la etapa vegetativa está influida por las condiciones climáticas. Este factor afecta directamente a la variación del número de casos que se producen cada año (Riet-Correa et al. 2007).

En Papua Nueva Guinea, la CE se da en el ganado de todas las edades, afectando aproximadamente al 10% del rebaño, principalmente a los animales destetados, con aproximadamente 6-8 semanas después de su introducción en los pastos (Copland, 1975). En Jamaica, la CE asociada a *Stenotaphrum secundatum* afecta bovinos, ovinos y caprinos, con una prevalencia del 10%-60% en (Arnold & Fincham, 1997).

Natural y experimentalmente, la CE es caracterizada por una evolución crónica, y las manifestaciones clínicas son secundarias a la mineralización sistémica. Los signos clínicos iniciales se caracterizan por cambios en el estado general de nutrición y producción, como anorexia, emaciación, retracción abdominal y disminución de la producción de carne y leche. Se observan comúnmente cambios posturales, como la marcha corta y rígida, y la cifosis toracolumbar. A medida que la condición clínica evoluciona, estos cambios posturales empeoran y se hacen más evidentes. Los animales permanecen echados durante largos períodos, tienen dificultad para levantarse y, cuando pueden levantarse, asumen una posición de apoyo en el carpo (de rodillas), especialmente en los miembros torácicos. Cuando están de pie, descansan los miembros en la punta de los cascos. Los miembros quedan ligeramente arqueados, y las articulaciones muestran una movilidad reducida debido a la mineralización de los tendones (Gimeno, 2001; Riet-Correa et al. 2007). Además, se han descrito alopecias e hiperqueratosis en la piel de la región carpiana de los búfalos (Santos et al. 2011).

Los animales con lesiones cardiovasculares graves muestran resistencia a moverse y, cuando se les estimula, desarrollan taquipnea, disnea, taquicardia y edema pulmonar, y pueden progresar rápidamente hasta la muerte (Rissi et al. 2009; García y Santos et al. 2012). Los cambios cardíacos, como soplos y arritmias, pueden identificarse clínicamente (Döbereiner et al. 1971; Barros et al. 1992; Braun et al. 2000). Las elevaciones en los

niveles de calcio y fósforo séricos pueden detectarse a las pocas horas o hasta 24 h después del comienzo del consumo de la planta (Tokarnia et al. 2012).

Las dosis tóxicas de *Solanum glaucophyllum* son bien conocidas en conejos, ratas, gallinas y codornices japonesas, aunque los datos relativos a los rumiantes son escasos (Mello, 2003). Los signos clínicos y la muerte se reprodujeron experimentalmente en el ganado utilizando hojas secas de *Solanum glaucophyllum* en dosis de 0,82 g/kg, 1,0 g/kg y 0,22 g/kg semanales (Döbereiner et al. 1971). Las ovejas alimentadas con una dieta del 50% de *Nierembergia veitchii* seca, durante 21 días y el 10% durante 49 días desarrollaron CE (Riet-Correa et al. 1993). *Nierembergia veitchii* fue 32-78 veces menos tóxica que *Solanum glaucophyllum* (Riet-Correa et al. 1987, Riet-Correa et al. 1993). Las ovejas también desarrollaron la enfermedad cuando pastorearon durante 90 días en un potrero de 625 m² infestado de *Nierembergia rivularis* (García y Santos et al. 2012).

PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

Las alteraciones patológicas encontradas en animales intoxicados por plantas calcinogénicas se han notificado ampliamente en diferentes regiones del mundo. El diagnóstico debe basarse en los hallazgos epidemiológicos, signos clínicos, hallazgos de necropsia e histopatología y en evidencias de consumo de plantas. La presencia de mineralización sistémica macro y microscópica es esencial para el diagnóstico final de la CE (Morris, 1982; Mello, 2003).

Los animales presentan una mala condición corporal (Figura 4A y B) y pérdida de las reservas de grasa. Los hallazgos macroscópicos en las arterias elásticas y musculares incluyen una marcada pérdida de elasticidad, con extensas áreas de irregularidad en la superficie íntima, y múltiples formaciones de placas que son blancas, firmes y prominentes (Figura 4C).

En el corazón, la mineralización se produce principalmente en el lado izquierdo, afectando a las válvulas cardíacas, las cuerdas tendinosas (Figura 4D) y la superficie del endocardio. Los pulmones no colapsan, quedan pálidos y firmes al palpar, a veces con zonas de enfisema y edema pulmonar. La nefrocalcinosis se caracteriza por estriaciones blanquecinas dispuestas radialmente en las regiones corticales y medulares renales. También se puede encontrar mineralización en los tendones. La osteopetrosis consiste en huesos densos y pesados, con una marcada reducción en la cavidad medular. Se pueden encontrar lesiones erosivas en el cartílago de la articulación (Barros et al. 1970; Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1987, Riet-Correa et al. 2007; Gimeno, 2001; Tokarnia et al. 2012; Odriozola et al. 2017). Ocasionalmente, es evidente la mineralización de la túnica muscular del útero, el rumen, el omaso y el abomaso (Barros et al. 1992; Rissi et al. 2009).

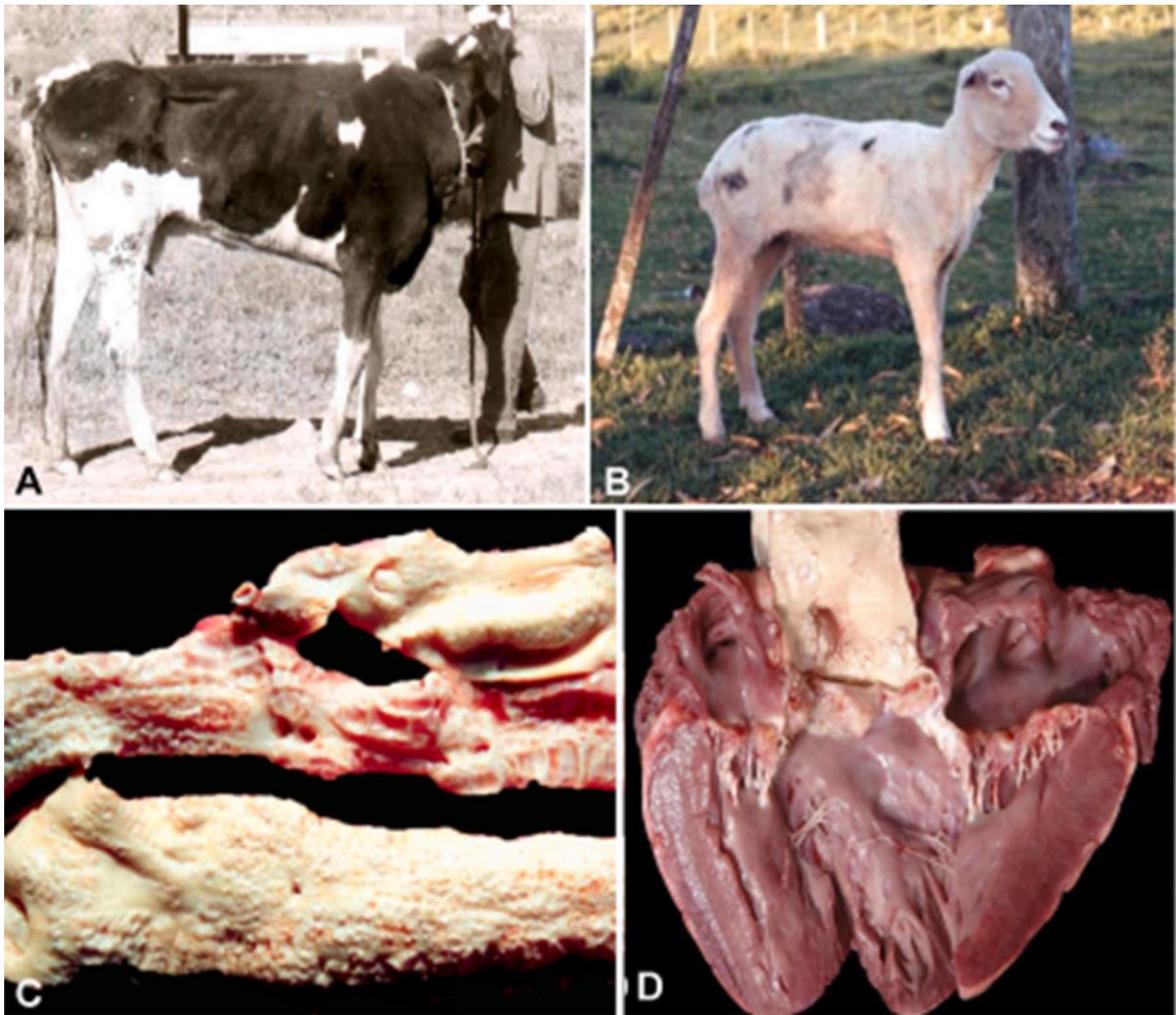


Figura 4. Calcinosis enzoótica. **A)** Bovino intoxicado por *Solanum glaucophyllum* mostrando abdomen retraído, emaciación y miembros torácicos apoyados en las puntas de los cascos (Riet-Correa et al. 1975). **B)** Ovino intoxicado por *Nierembergia veitchii* presentando mala condición corporal. **C)** Aorta de una oveja mostrando irregularidad de la superficie de la íntima y placas de mineralización multifocales a coalescentes (Riet-Correa et al. 1993). **D)** Ovino intoxicado por *Nierembergia rivularis*. Corazón. Mineralización multifocal de los cordones tendinosos, válvulas y aorta.

Histológicamente, se pueden verificar áreas de mineralización en las arterias musculares, con diversos grados de mineralización en la capa media (Figura 5A) y pérdida de ondulación de la lámina elástica interna. En casos avanzados, la mineralización es extensa en la capa media, con la aparición de metaplasia ósea y cartilaginosa (Figura 5B) asociada a la infiltración de macrófagos (Barros et al. 1970; Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1987; Gimeno, 2001; Tokarnia et al. 2012; Odriozola et al. 2017).

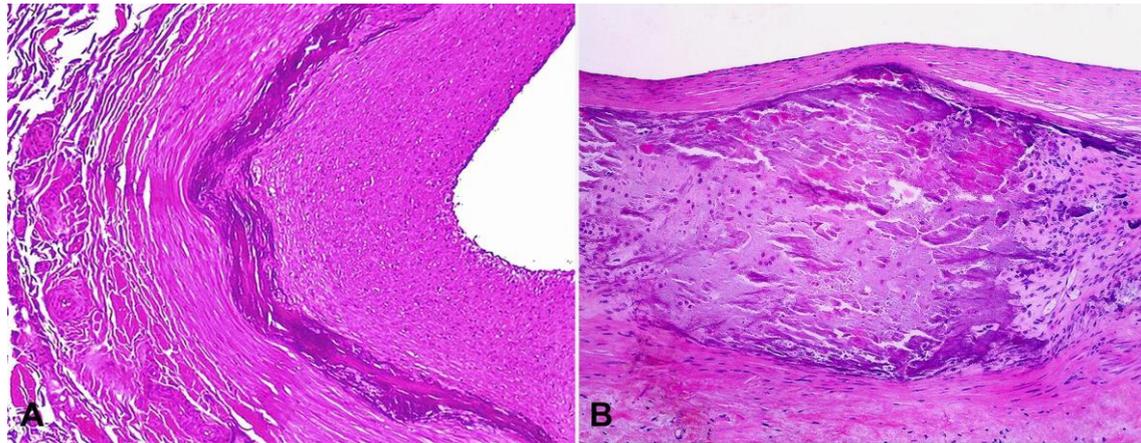


Figura 5. Ovino intoxicado naturalmente por *Nierembergia veitchii*. Carótida. **A)** Acentuada hiperplasia de la capa íntima y extensa área de mineralización de la capa media. H&E. 200x. **B)** Metaplasia ósea y cartilaginosa y mineralización de la capa media. Hiperplasia leve de la capa íntima. H&E. 100x.

Existe una marcada hiperplasia de la capa íntima no mineralizada caracterizada por una gruesa capa de células fusiformes, con un núcleo ovalado y un citoplasma claro dispuesto en paralelo a las células endoteliales (Vasconcelos et al. 1998). En cambio, las arterias elásticas exhiben una mineralización íntima y medial (Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1975; Done et al. 1976).

La mineralización vascular de los vasos de mediano y gran calibre es una característica distintiva de la CE, pero no se limita a estos vasos; los mismos cambios son evidentes en el examen histológico de los capilares renales y de la *rete mirabile carotídea* (Rissi et al. 2007, 2009). El calcio se acumula en el lumen de los túbulos renales y mineraliza la membrana basal y el intersticio renal (Tokarnia et al. 2012).

En los pulmones, la pared alveolar se engruesa, formando grandes áreas de aspecto mixoide compuestas por células fusiformes, macrófagos, células gigantes y áreas de mineralización (Barros & Gimeno, 2000). Se observa mineralización de los septos alveolares e interlobulares, de la capa muscular y del cartílago bronquial; a veces se observa metaplasia cartilaginosa y ósea. Los tendones exhiben áreas de mineralización con metaplasia cartilaginosa. En el corazón hay áreas de mineralización con infiltración de macrófagos y proliferación de fibroblastos en el endocardio y el miocardio, así como áreas multifocales de metaplasia cartilaginosa.

Las alteraciones en el tejido endocrino incluyen la hiperplasia (Riet-Correa et al. 1987) y, ocasionalmente, el adenoma (Neumann & Klopfer, 1975) y el carcinoma (Machado et al. 2020) de las células C de la tiroides, y la atrofia de las células principales de la paratiroides (Riet-Correa et al. 1987).

En el tejido óseo, en las epífisis y metáfisis, se observa una osteopetrosis grave, caracterizada por el aumento de tamaño y la confluencia de las trabéculas. La epífisis

exhibe una mezcla de hueso compacto y trabecular. En la metafisis se observan bandas transversales de hueso paralelas a la placa epifisaria. En el hueso diafisario, la corteza es muy gruesa, con pequeños conductos de Havers y una pobre diferenciación entre los osteones primarios y secundarios (Riet-Correa et al. 1987). También se ha observado osteonecrosis caracterizada por necrosis de los osteocitos y desintegración del tejido óseo (Riet-Correa et al. 1987).

Los estudios ultraestructurales realizados mediante microscopía electrónica de transmisión han revelado cambios en los componentes estructurales de las células implicadas en la patogenia de la intoxicación por plantas calcinogénicas y han facilitado la comprensión de la patogenia de la enfermedad (Barros et al. 1981; Vasconcelos et al. 1998; Barros & Gimeno, 2000; Barros et al. 2006; Tokarnia et al. 2012). Las células endoteliales pueden presentar hinchazón, dilatación del retículo endoplásmico y edema subendotelial. La principal modificación se encuentra en las CMLA, que están muy cerca de la lámina elástica interna en la capa media. Las CMLA están en un "estado contráctil" y "estado sintético". Las células con un fenotipo sintético exhiben una pérdida sustancial de elementos contráctiles y un aumento en el número de ribosomas, mitocondrias y Golgi, así como un agrandamiento y dilatación del retículo sarcoplásmico. Hay un aumento de casi el 318% del volumen citoplasmático de las organelas sintéticas de las CMLA sintéticas en comparación con los elementos contráctiles de las CMLA contráctil (Vasconcelos et al. 1998).

Las zonas mineralizadas de la capa media se asemejan a estructuras amorfas o a bandas electrodensas concéntricas, a veces con células musculares lisas modificadas o células mesenquimales que impregnan este material (Vasconcelos et al. 1998). La hiperplasia de la íntima se asocia frecuentemente con la CE en ovinos (Barros et al. 1970; Riet-Correa et al. 1987; Rissi et al. 2007, Rissi et al. 2009) y bovinos (Lynd et al. 1965; Carrillo & Worker, 1967; Köhler & Libiseller, 1970; Krook et al. 1975a).

Las CMLA contráctiles se desdiferencian en un tipo sintético y migran de la capa media a la íntima a través de las fenestraciones de la lámina elástica interna, y proliferan para formar la hiperplasia de la íntima (Vasconcelos et al. 1998). Las CMLA sintéticas, activadas por los fibroblastos, exhiben hiperplasia del retículo endoplasmático rugoso, y se encuentran células gigantes multinucleadas dentro de las áreas de mineralización pulmonar (Barros & Gimeno, 2000). La hipertrofia y degranulación de las células C de la tiroides, además de la inactividad de las células principales de la paratiroides, también se observan de manera ultraestructural (Tokarnia et al. 2012).

En un estudio experimental realizado en conejos con un extracto de *Solanum glaucophyllum*, se observó el efecto citotóxico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el tejido óseo, que provocó la atrofia, la degeneración y la necrosis de los osteocitos y los osteoclastos, lo que dio lugar a la falta de reabsorción ósea y a la consiguiente osteopetrosis (Barros et al. 1996).

Los efectos de la vitamina D se han asociado con necrosis y calcificación del sarcoplasma de cardiomiocitos (Marçolla et al. 1997), y con la calcificación endocelular de los macrófagos descrita en la gastropatía inducida experimentalmente en conejos (Moraña et al. 1994).

La expresión de las proteínas óseas no colágenas se demostró mediante inmunohistoquímica en los pulmones mineralizados de animales intoxicados (Barros & Gimeno, 2000; Barros et al. 2006). Nuevas investigaciones que examinen el papel de estas proteínas en las lesiones arteriales son necesarias para elucidación del mecanismo patogénico de la CE.

CONTROL Y PROFILAXIS

Las intoxicaciones por *Cestrum diurnum*, *Nierembergia rivularis*, *Nierembergia veitchii*, *Solanum glaucophyllum*, *Solanum stuckertii*, *Solanum torvum* y *Trisetum flavescens* producen una enfermedad crónica debilitante para la que no hay tratamiento eficaz. Por lo tanto, técnicas de manejo de pasturas están indicados para evitar el consumo de las plantas, ya que el proceso de secado y ensilado no elimina el potencial tóxico de las mismas (Heinritzi et al. 1977; Riet-Correa et al. 1987, Riet-Correa et al. 2007).

Baja reversibilidad de la mineralización y ligero aumento de peso, pueden obtenerse cuando los animales intoxicados son llevados a zonas donde la planta no se encuentra (Collier, 1926; Döbereiner et al. 1971; Barros et al. 1992; Gimeno, 2001). No obstante, está indicado no someter a estos animales a un manejo estresante porque pueden desarrollar un edema pulmonar agudo debido a las lesiones ya instaladas en el sistema cardiovascular, especialmente una insuficiencia valvular grave (Barros et al. 1992; Rissi et al. 2009).

7. CAPÍTULO 2: EFECTOS DE LA INTOXICACIÓN POR *Nierembergia veitchii* SOBRE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS ARTERIALES: UNA CONTRIBUCIÓN A LA PATOGENIA DE LA CALCINOSIS ENZOÓTICA

RESUMEN

La calcificación vascular es una alteración típica de la calcinosis enzoótica (CE). Se realizaron investigaciones histopatológicas, ultraestructurales e inmunohistoquímicas en las arterias carótidas de siete ovinos naturalmente intoxicados por *Nierembergia veitchii*. Histológicamente se observó hiperplasia moderada a marcada de la capa íntima con ausencia de calcificación. La túnica media exhibió calcificación leve a acentuada y metaplasia ósea y cartilaginosa. Los ovinos con CE mostraron sobreexpresión arterial de osteopontina y fosfatasa alcalina no tejido específica e inmunomarcación para osteonectina y osteocalcina tanto en la íntima como en la media. El principal hallazgo ultraestructural en la capa media fue un marcado cambio fenotípico de las células musculares lisas arteriales contráctiles (CMLAc) para un fenotipo sintético (CMLAs). En la túnica media, las CMLAs produjeron vesículas matriciales y exosomas, formando gránulos de microcalcificación asociados con la calcificación arterial. Las CMLAs también migraron a la túnica íntima, pero no se observaron vesículas, exosomas ni calcificación. La ausencia de vesículas matriciales y exosomas en la hiperplasia de la íntima, incluso en presencia de proteínas óseas no colágenas, fosfatasa alcalina no tejido específica y receptores de vitamina D, refuerza la hipótesis de que la presencia de vesículas matriciales y exosomas es crucial para el desarrollo de la calcificación arterial en CE. Se propone que los dos fenotipos diferentes de CMLAs en la calcinosis se deben a la expresión de al menos dos tipos genéticamente diferentes de estas células inducida por la acción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Palabras clave: calcificación arterial, plantas calcinogénicas, calcinosis enzoótica, patogenia, vesículas matriciales

INTRODUCCIÓN

La intoxicación por plantas calcinogénicas, conocida como calcinosis enzoótica (CE), se considera la principal causa de calcificación arterial en animales de producción. El $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol) o sus derivados han sido identificados como componentes tóxicos de algunas de estas plantas tóxicas (Machado et al. 2020). Aunque la CE se ha descrito durante más de 100 años, su mecanismo patogénico aún no se ha determinado por completo (Machado et al. 2020).

Se ha observado calcificación de arterias elásticas en la íntima y media, asociada con metaplasia ósea y cartilaginosa en la túnica media en herbívoros domésticos con CE desde principios del siglo pasado (Collier, 1927; Tibiriçá, 1927a, 1927b; Lynd et al., 1965; Carrillo & Worker, 1967; Köhler & Libiseller, 1970; Dirksen et al. 1970; Barros et al.

1970; Döbereiner et al. 1971; Krook et al. 1975a, 1975b; Riet-Correa et al. 1975; Riet-Correa et al. 1987) y en la literatura más reciente (Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009; Machado et al. 2020).

Sin embargo, las lesiones en las arterias musculares son diferentes y no se observa calcificación en la íntima; La calcificación solo se observa en la capa media. En ovejas intoxicadas por *Nierembergia veitchii*, la íntima arterial muestra hiperplasia sin calcificación y en la media extensas áreas de calcificación y metaplasia ósea y cartilaginosa en estadios avanzados de la enfermedad (Vasconcelos et al. 1998).

El proceso de calcificación arterial en humanos implica mecanismos complejos aún no completamente establecidos, que han sido ampliamente estudiados durante más de 200 años debido a su impacto en la salud pública. La calcificación arterial comprende eventos de biomineralización activos y dinámicos, similares a los observados en el proceso de formación de hueso (Wallin et al. 2001; Wang et al. 2018). Las enfermedades genéticas, la hiperlipidemia, la enfermedad renal crónica, la diabetes, el lupus eritematoso sistémico, la nicotina e intoxicación por warfarina y vitamina D se han relacionado con la calcificación arterial en humanos (Wallin et al. 2001; Durham et al. 2018).

En 1981, un estudio experimental con conejos intoxicados por *Solanum glaucophyllum* (sin. *Solanum malacoxylum*), una planta calcinogénica bien conocida, encontró una marcada disminución de los componentes contráctiles y un aumento sustancial del aparato sintético en las células musculares lisas arteriales (Barros et al. 1981). Más tarde, estas células se denominaron células musculares lisas arteriales contráctiles (CMLAc), que pueden cambiar de fenotipo a células musculares lisas arteriales sintéticas (CMLAs) (Durham et al. 2018). El papel de las células musculares lisas arteriales en la calcificación arterial se ha demostrado en diferentes enfermedades vasculares humanas (Gadeau et al. 1993; Durham et al. 2018). Las células musculares lisas arteriales tienen capacidad de hacer desdiferenciación y transdiferenciación, lo que conduce a la metaplasia celular y la expresión de proteínas, y participan activamente en el proceso de calcificación arterial (Merrel et al. 2016; Durham et al. 2018). Recientemente se ha publicado una descripción general de las implicaciones de las células musculares lisas arteriales en la CE (Machado et al., 2020).

Este estudio tiene como objetivo caracterizar los hallazgos histopatológicos, ultraestructurales y la expresión de proteínas óseas no colágenas, fosfatasa alcalina inespecífica de tejido y el receptor de vitamina D en las arterias carótidas de ovinos naturalmente intoxicados por *Nierembergia veitchii* con CE. Además, discutir el papel de estos factores en el proceso de calcificación arterial en la intoxicación por plantas calcinogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron fragmentos de las arterias carótidas del archivo de bloques de parafina del sector de Patología Veterinaria del Departamento de Patología de la Universidad Federal de Santa María, derivados de un trabajo realizado por Vasconcelos et al. (1998). Los bloques procedían de siete ovinos, un macho y seis hembras, de tres años, de raza mixta, con signos clínicos y lesiones de calcinosis enzoótica de un rebaño criado en pastos infestados por *Nierembergia veitchii*. Los bloques fueron procesados en el Laboratorio de Histopatología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) – Tacuarembó y las secciones de interés fueron coloreadas por el método de Hematoxilina y Eosina y observadas en microscopio óptico.

Inmunohistoquímica

El ensayo inmunohistoquímico se realizó en el Laboratorio de Patología, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Brasilia. Fragmentos de arterias carótidas fueron sometidas a el método biotina-peroxidasa-estreptavidina (ImmunoDetector DAB, HRP, BioSB INC., Santa Barbara, CA, EE. UU.), seguida de incubación nocturna de los anticuerpos primarios (Tabla 1).

Se utilizó una arteria carótida de oveja normal (control) para comparar la distribución y la intensidad de la inmunomarcación con las arterias lesionadas. Se omitieron los anticuerpos primarios y las secciones de tejido se incubaron con suero de conejo no inmune (1:200) como procedimiento de control negativo. Las arterias fueron sistemáticamente evaluadas de acuerdo con los anticuerpos primarios utilizados; distribución en las capas (íntima; media y adventicia); y su intensidad (- ausente; + discreta; ++ moderada; +++ acentuada).

Tabla 1. Antígenos, anticuerpos y diluciones usadas en la técnica inmunohistoquímica en las carótidas de ovinos intoxicados naturalmente por *Nierembergia veitchii*

Antígeno	Fabricante	Anticuerpos* [◊] §	Dilución [♦]	Control positivo [*]
α-actina de musculo liso	Abcam Plc., UK	Conejo policlonal	1:400	Intestino
FANTE	GeneTex Inc., USA	Conejo policlonal	1:1000	Páncreas
Osteocalcina	Abcam Plc., UK	OCG3 monoclonal	1:200	Hueso
Osteopontina	Abcam Plc., UK	Conejo policlonal	1:400	Glándula mamaria
SPARC (osteonectina)	Abcam Plc., UK	SP205 monoclonal	1:100	Riñón
Receptor Vitamin D	Abcam Plc., UK	Conejo policlonal	1:1000	Intestino

* Recuperación del antígeno: citrato pH 6.0, 125°C, 3 min, utilizándose olla de presión; [◊]Método de la detección: biotina–peroxidasa–streptavidina; [§]Cromógeno: DAB = 3,3'-diaminobenzidina; [♦]Incubación nocturna; *Oveja. FANTE: Fosfatasa alcalina no tejido específica.

Microscopia electrónica de transmisión

Se fijaron muestras de arterias carótidas de las ovejas (1 mm³) en glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en tampón de cacodilato de sodio (0,03 M y pH 7,4), post-

fijadas en tetróxido de osmio al 1%, deshidratadas en etanol e incluidas en Epon. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de metileno, mientras que los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS

Histopatología

Se observó hiperplasia discreta a marcada de la íntima (Figura 1) y ausencia de mineralización. En la túnica media se observaron extensas áreas de calcificación, ocasionalmente asociadas a áreas de metaplasia ósea y cartilaginosa. Las áreas de metaplasia aumentaban gradualmente hasta ocupar casi toda la túnica media.

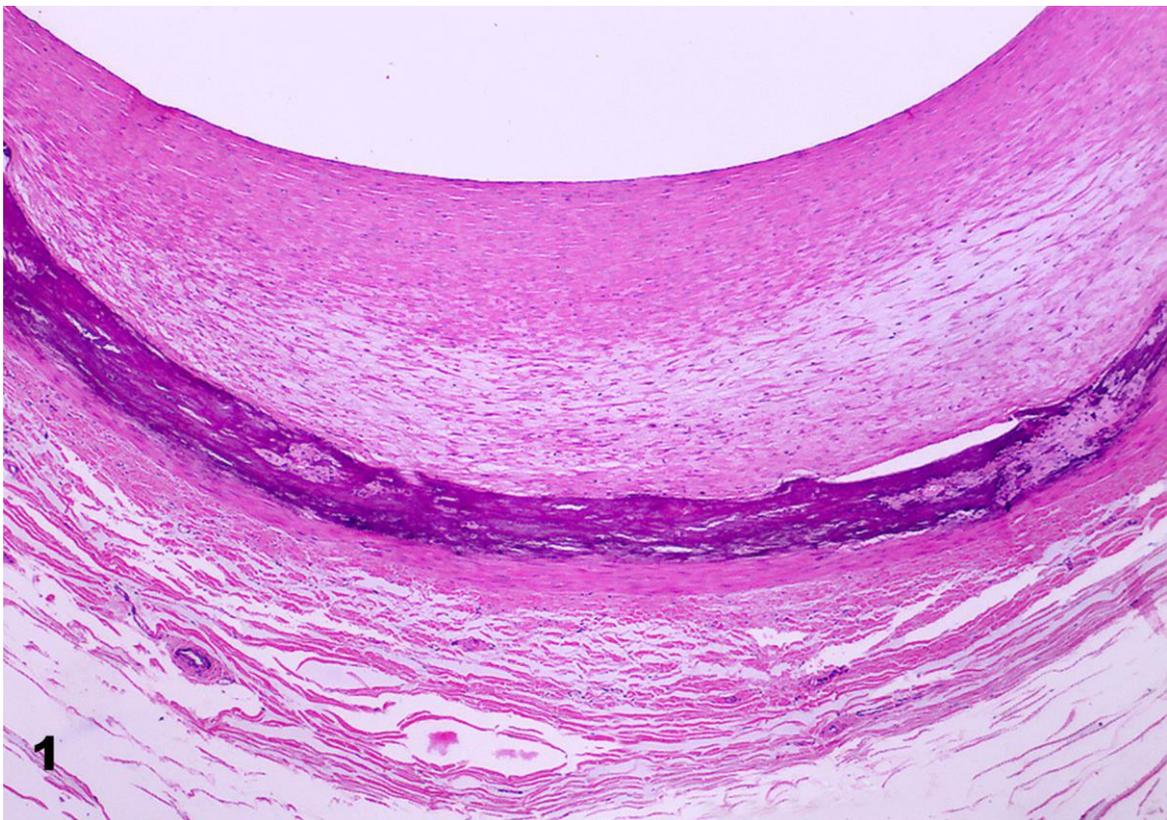


Figura 1: Intoxicación natural por *Nierembergia veitchii*. Arteria carótida, Ovino 1. Marcada hiperplasia de la capa íntima y calcificación de la media con áreas multifocales a coalescentes de metaplasia ósea y cartilaginosa. HE, obj. 4x.

Inmunohistoquímica

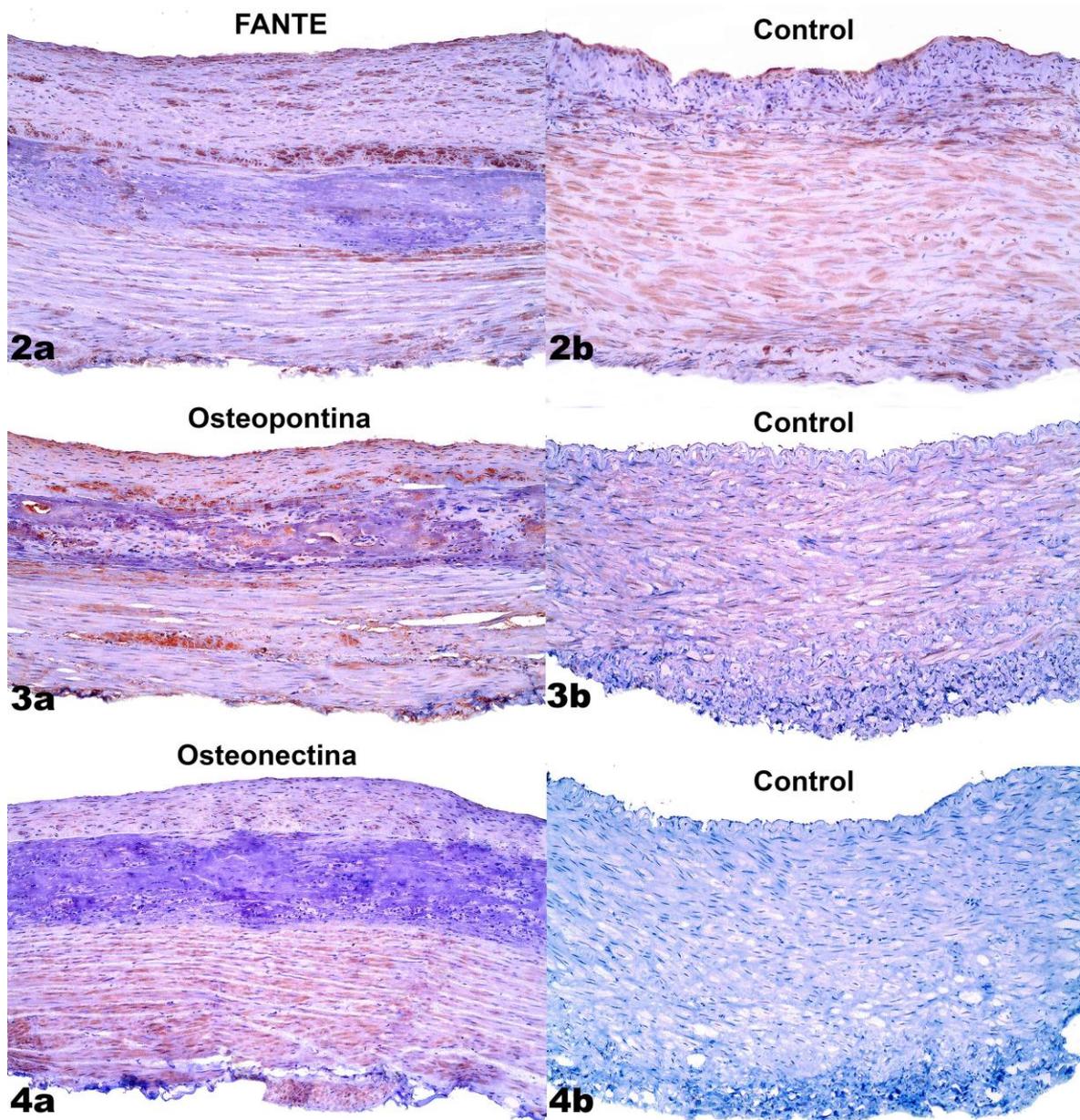
Los resultados de la evaluación inmunohistoquímica de las arterias carótidas se resumen en la Tabla 2. Las diferencias más relevantes observadas entre ovejas con CE y el animal control fueron la sobreexpresión arterial de osteopontina y fosfatasa alcalina no tejido

específica en animales con CE. La osteonectina y la osteocalcina solo se expresaron en tejidos arteriales de animales con CE, no en el animal control. La α -actina del músculo liso y el receptor de vitamina D tenían intensidades de inmunomarcación similares tanto en las ovejas afectadas como en el control. Sin embargo, áreas arteriales más extensas mostraron inmunomarcación para estos anticuerpos en animales con CE debido a la diferencia entre la espesura del control y la de las arterias carótidas afectadas.

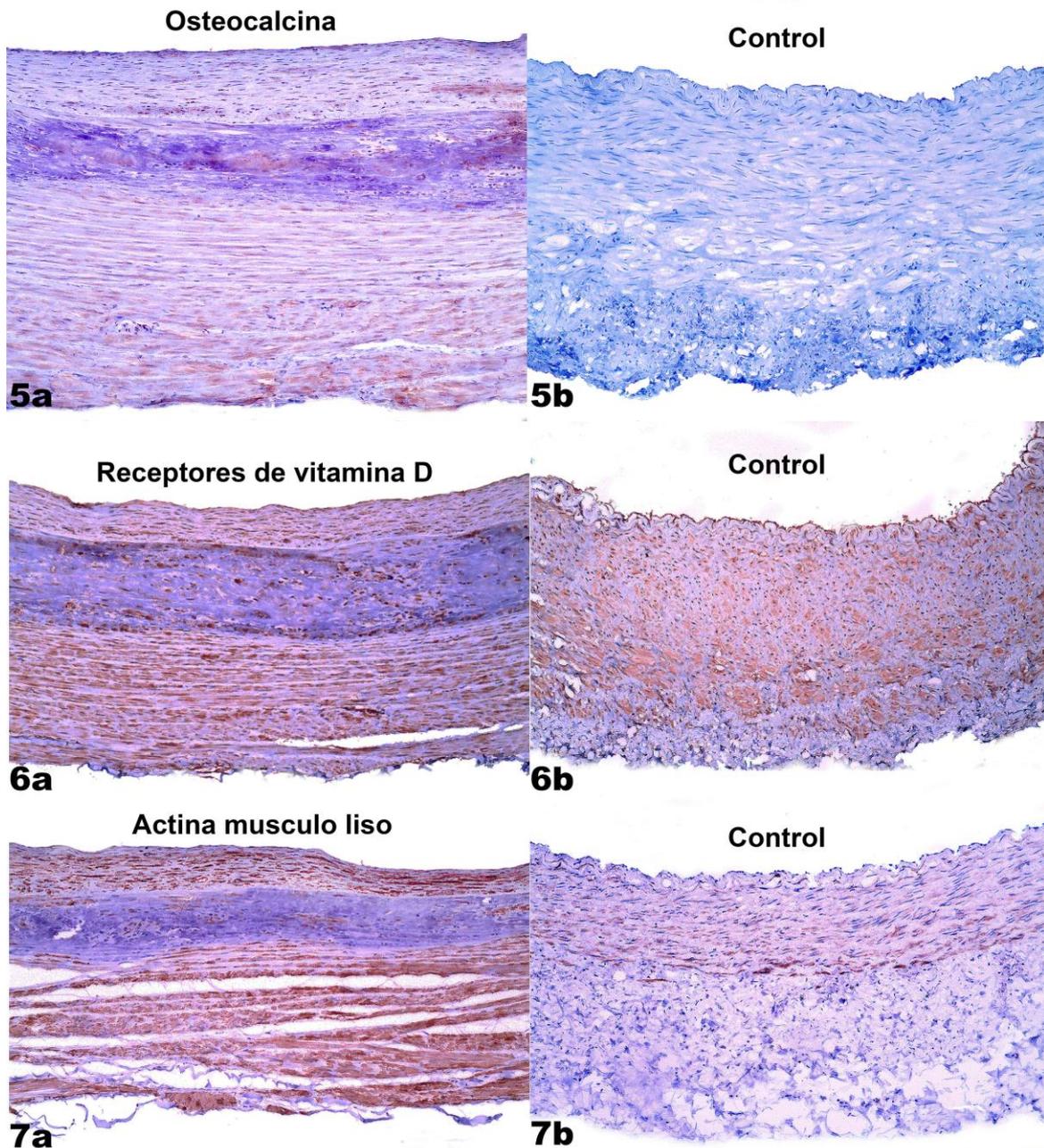
Tabla 2. Datos del análisis inmunohistoquímico de arterias carótidas de ovinos con CE y del animal control.

Anticuerpo	Capas de la arteria	Ovino							CONTROL
		1	2	3	4	5	6	7	
FANTE	Endotelio	++	+	+	+	+	+	+	+
	Íntima	+++	++	++	++	++	+	+	+
	Media	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	Adventicia	+	+	+	+	+	+	+	+
Osteopontina	Endotelio	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	Íntima	++	++	++	++	++	++	+	+
	Media	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
	Adventicia	+	+	+	+	+	+	+	+
Osteonectina	Endotelio	+	+	+	+	+	+	+	-
	Íntima	+	+	+	+	+	+	+	-
	Media	++	++	+++	++	+++	+++	+++	-
	Adventicia	-	-	-		-	-	-	-
Osteocalcina	Endotelio	+	+	+	+	+	+	+	-
	Íntima	++	+	+	+	++	+	+	-
	Media	+++	+++	++	+++	+++	++	++	-
	Adventicia	-	-	-	-	-	-	-	-
Receptor de vitamina D	Endotelio	++	++	+++	++	++	+++	+++	++
	Íntima	+	+	+	+	+	+	+	++
	Media	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Adventicia	+	+	+	+	+	+	+	+++
α -actina musculo liso	Endotelio	-	-	-	-	-	-	-	-
	Íntima	++	++	++	++	++	++	++	+
	Media	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
	Adventicia	++	++	++	++	++	++	++	++

Intensidad de la inmunomarcación: - ausente; + discreta; ++ moderada; +++ acentuada. FANTE: fosfatasa alcalina no tejido específica.



Figuras 2-4. Inmunohistoquímica en arterias carótidas de ovinos con calcinosis enzoótica asociada al consumo de *Nierembergia veitchii*. **Figura 2a.** Arteria carótida, Ovino 1. Sobreexpresión difusa de fosfatasa alcalina no tejido específica en la capa media calcificada. Inmunohistoquímica, Fosfatasa alcalina no tejido específica (FANTE), obj. 10x. **Figura 2b.** Arteria carótida, ovino control. Inmunomarcación difusa leve. Inmunohistoquímica, Fosfatasa alcalina no tejido específica (FANTE), obj. 10x. **Figura 3a.** Arteria carótida, Ovino 1. Sobreexpresión en la capa media, principalmente en las áreas calcificadas y en la metaplasia ósea y cartilaginosa. Inmunohistoquímica, Osteopontina. **Figura 3b.** Arteria carótida, ovino control. Inmunomarcación difusa leve. Inmunohistoquímica, Osteopontina, obj. 10x. **Figura 4a.** Arteria carótida, Ovino 7. Inmunomarcación discreta de la capa media calcificada. Inmunohistoquímica, Osteonectina. **Figura 4b.** Arteria carótida, ovino control. Inmunomarcación negativa. Inmunohistoquímica, Osteonectina, obj. 10x.



Figuras 5-7. Inmunohistoquímica en arterias carótidas de ovinos con calcinosis enzoótica asociada al consumo de *Nierembergia veitchii*. **Figura 5a.** Arteria carótida, Ovino 2. Inmunomarcación moderada en la capa media calcificada. **Figura 5b.** Arteria carótida, ovino control. Inmunomarcación negativa. Inmunohistoquímica, Osteocalcina, obj. 10x. **Figura 6a.** Arteria carótida, Ovino 3. Inmunomarcación fuerte y difusa. **Figura 6b.** Arteria carótida, ovino control. Inmunomarcación difusa moderada. Inmunohistoquímica, Receptores vitamina D, obj. 10x. **Figura 7a.** Arteria carótida, Ovino 3. Inmunomarcación fuerte y difusa. **Figura 7b.** Arteria carótida, ovino control. Inmunomarcación difusa leve. Inmunohistoquímica, Actina musculo liso, obj. 10x.

Microscopia electrónica de transmisión

En la ultraestructura, se observaron varias graduaciones del proceso de desdiferenciación de las células musculares lisas arteriales. Al principio, las células conservaban intacta su estructura de fibrillas contráctiles (Figura 8). En el inicio del proceso de desdiferenciación, las células musculares lisas arteriales aún mostraban gran parte de los elementos contráctiles y la lámina basal estaba tortuosa y ausente en algunos lugares. El espacio perinuclear estaba aumentado y el retículo endoplasmático rugoso presentaba ligera proliferación (Figura 9). En un estado más avanzado de desdiferenciación se observó marcada disminución de los elementos contráctiles, abundante proliferación del retículo endoplasmático rugoso con marcada dilatación de las cisternas y aumento de Golgi y ribosomas. Había fragmentación y pérdida de porciones de la lámina basal y formación de vesículas matriciales en la fase de extrusión. Las células, en esta fase, ya se denominan células musculares lisas arteriales sintéticas (CMLAs).

A medida que la desdiferenciación avanzaba, las células musculares lisas arteriales mostraban marcada disminución de las fibrillas contráctiles y fragmentación y desaparición de la lámina basal. En el intersticio, algunas vesículas matriciales presentaban calcificación (Figura 9). Algunas de las CMLAs migraban de la media a través de las fenestras de la lámina elástica interna a la íntima (Figura 10). Las CMLAs que permanecieron en la túnica media producían vesículas matriciales que se calcificaban. Se observaron numerosos nódulos de microcalcificación en el intersticio de la media y en la superficie intimal de la lámina elástica interna cerca de las fenestras (Figura 11). Estos nódulos probablemente se forman por la mineralización de exosomas liberados por CMLAs. En el intersticio del tejido hiperplásico, había proliferación de fibras de colágeno y elastina recién formadas, y las CMLAs no mostraron formación y extrusión de vesículas matriciales o exosomas libres. Este comportamiento distinto de las CMLAs está presentado en la Figura 12 y la ilustración esquemática de los eventos patológicos que ocurren en las arterias musculares de animales con CE se resume en la Figura 13.

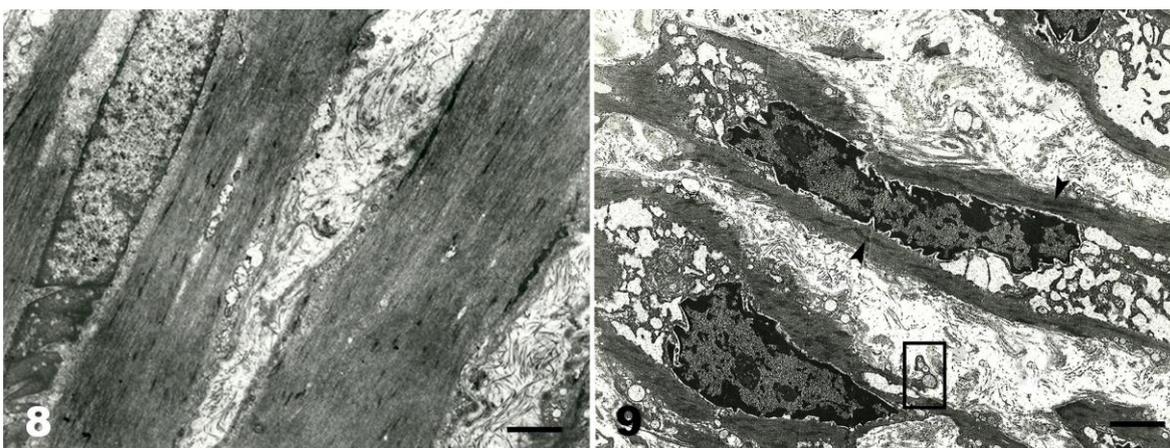


Figura 8-9. Alteraciones arteriales ultraestructurales en ovinos con calcinosis enzoótica asociada al consumo de *Nierembergia veitchii*. **Figura 8.** Arteria carótida, capa media. Células musculares lisas arteriales que presentan fenotipo contráctil. Bar = 1 μ m. **Figura 9.** Arteria carótida, túnica media. Las células musculares lisas arteriales están en el inicio del proceso de desdiferenciación. Hay disminución de elementos contráctiles (punta de flecha).

La lámina basal está fragmentada o ausente en algunos puntos y hay presencia de vesícula matricial (rectángulo negro). Microscopia electrónica de transmisión (MET). Bar = 1 μ m.

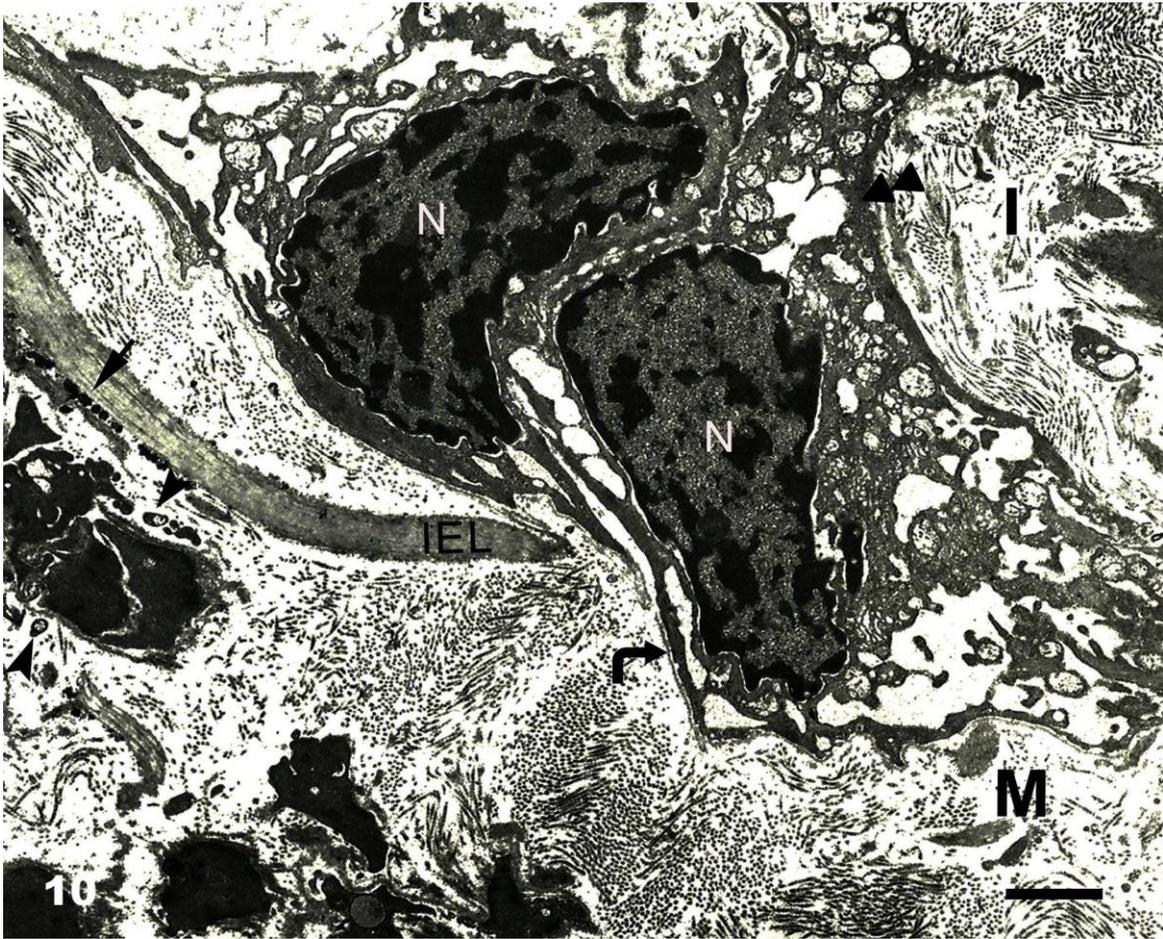


Figura 10. Alteraciones arteriales ultraestructurales en ovinos con calcinosis enzoótica asociada al consumo de *Nierembergia veitchii*. Arteria carótida. Dos CMLAs (N) que migran de la capa media (M) a la íntima (I) a través de la fenestra de la lámina elástica interna. La lámina basal de estas células está fragmentada o ausente (flecha curva). Se pueden observar puntos de calcificación en la parte medial de la lámina elástica interna (flechas). Hay algunas vesículas matriciales en inicio de calcificación (puntas de flecha). El sarcoplasma presenta una abundante proliferación de retículo endoplásmico muy dilatado. Las mitocondrias están dilatadas y las crestas desorganizadas. Los elementos contráctiles están restringidos a una posición sub sarcolemal (punta de flecha doble). Se observa proliferación intensa de colágeno en el intersticio. MET. Bar = 2 μ m.

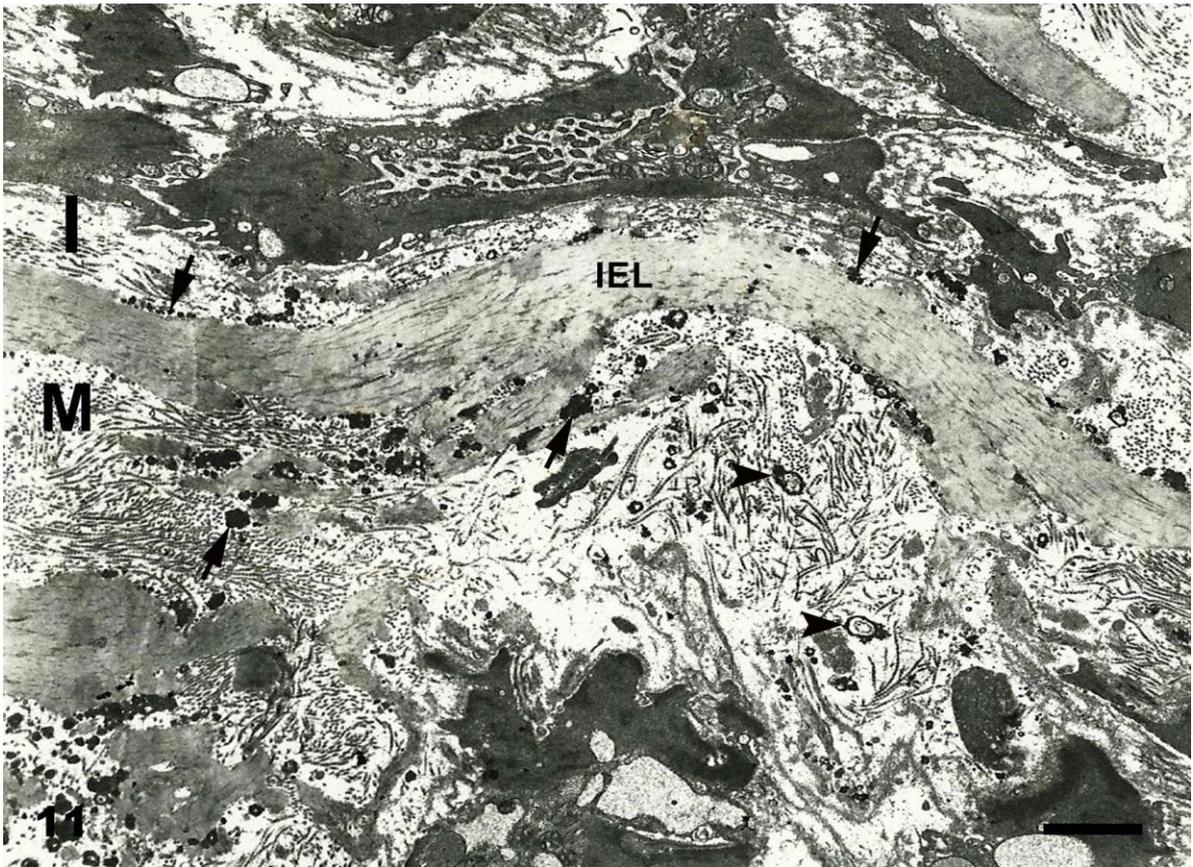


Figura 11. Alteraciones arteriales ultraestructurales en ovinos con calcinosis enzoótica asociada al consumo de *Nierembergia veitchii*. Arteria carótida. Migración de las CMLAs de la capa media (M) para la íntima (I) a través de la fenestra de la lámina elástica interna (estrellas). Se observan vesículas matriciales en inicio de calcificación (punta de flecha). MET. Bar = 1 μ m.

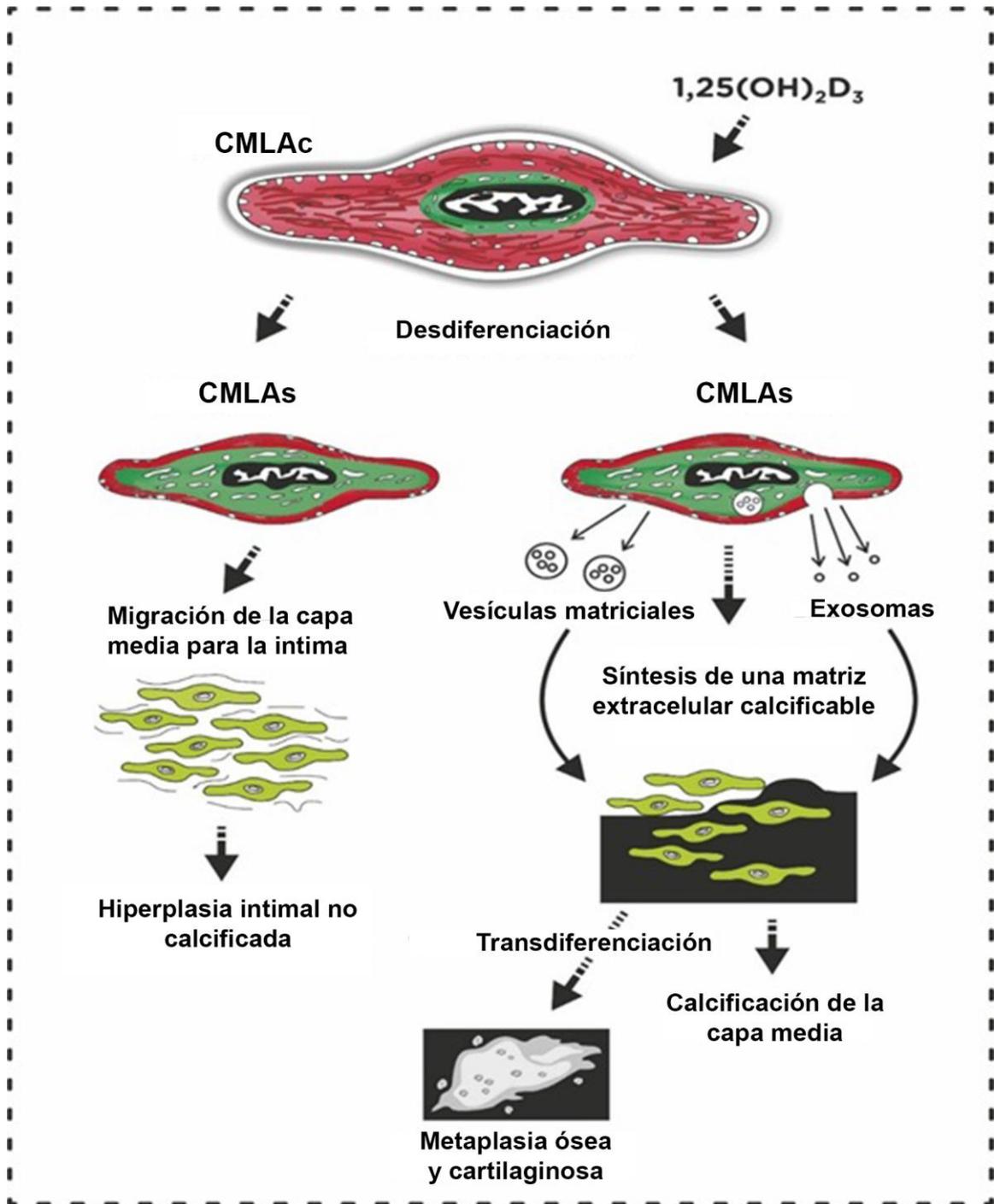


Figura 12. Diagrama que caracteriza el comportamiento de dos tipos distintos de células musculares lisas arteriales sintéticas (CMLAs). Básicamente la distinción entre ellas es la capacidad de producir vesículas matriciales y exosomas que son fundamentales para el desarrollo del proceso de calcificación arterial en la CE.

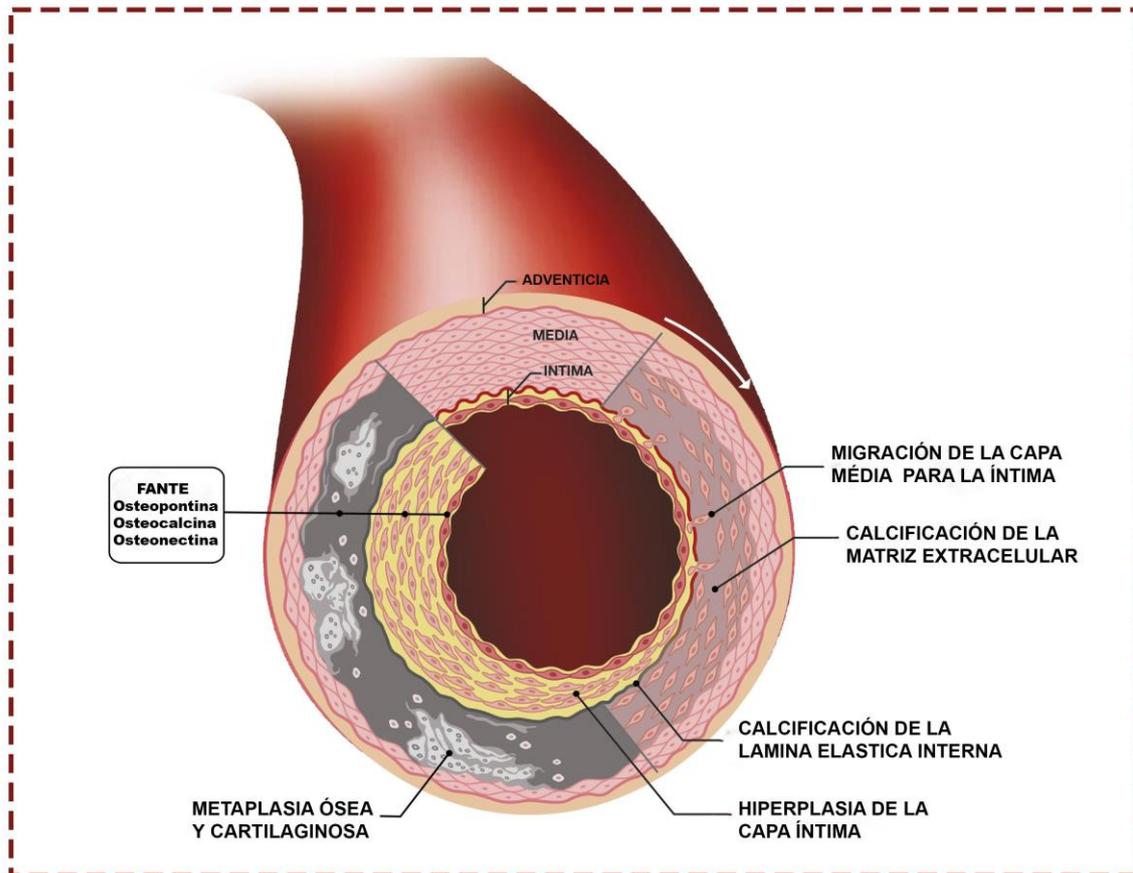


Figura 13: Ilustración esquemática de los eventos morfológicos y localización de expresión de proteínas óseas no colágenas y fosfatasa alcalina no tejido específica en arterias musculares en la calcinosis enzoótica.

DISCUSIÓN

Los mecanismos de calcificación vascular y de tejidos blandos aún son controvertidos y no se han aclarado completamente en la literatura veterinaria, y existe una patogénesis compleja que involucra interacciones entre las células musculares lisas arteriales, los componentes de la matriz extracelular y la señalización química (Machado et al. 2020). La hiperplasia de la íntima no calcificada y la calcificación medial asociada con la metaplasia ósea y cartilaginosa en la arteria carótida fueron las principales características microscópicas observadas en este estudio, similares a los descritos anteriormente en las arterias musculares de animales con CE (Barros et al. 1970; Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1987; Riet-Correa et al. 1993; Vasconcelos et al. 1998; Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009; Machado et al. 2020).

La sobreexpresión de osteopontina, observada en todos los animales intoxicados, se ha relacionado con la calcificación arterial y la estimulación de la proliferación, migración y adhesión celular (Gadeau et al. 1993). La sobreexpresión de osteopontina se considera un buen indicador de enfermedades vasculares (Lok y Lyle, 2019). Además, la osteopontina también participa en la aterosclerosis (Cho et al. 2009) y está estrechamente relacionada

con la proliferación de células musculares lisas arteriales en enfermedades vasculares en humanos (Gadeau et al. 1993). La compleja estructura de la osteopontina permite su interacción con residuos electronegativos de ácido glutámico y aspártico, sitios de sustrato de proteína serina treonina quinasa y proteínas putativas de unión al calcio, que determinan la capacidad de la osteopontina para regular la formación de cristales de apatita (Steitz et al., 2002). Por el contrario, los efectos inhibidores de la osteopontina sobre el proceso de calcificación arterial se han demostrado *in vitro* (Wada et al. 1999; Jono et al. 2000; Si et al. 2020). Los múltiples efectos biológicos de la osteopontina son un obstáculo para correlacionar observaciones únicas en modelos experimentales *in vivo* (Si et al. 2020). La sobreexpresión de osteopontina observada en ovejas intoxicadas por plantas calcinogénicas con extensas áreas de calcificación arterial sugiere el papel de esta proteína en la proliferación de células del músculo liso vascular y la calcificación y engrosamiento arterial.

En nuestro estudio, la expresión de osteocalcina, osteonectina y osteopontina se detectó en arterias carótidas de animales con CE y siempre estuvo relacionada con áreas calcificadas, lo que sugiere su participación en el proceso de calcificación. Estas proteínas óseas no colágenas están relacionadas con el proceso de calcificación extraósea (Shetty et al. 2006), como se observa en las áreas de metaplasia y calcificación arteriales en ovejas afectadas.

Estos resultados son similares a los descritos en carótidas con aterosclerosis en humanos (Bini et al. 1999) y en los pulmones de conejos intoxicados experimentalmente por *Solanum glaucophyllum* (Barros et al. 2006) y ovejas naturalmente intoxicadas por *Nierembergia veitchii* (Barros y Gimeno, 2000). Sin embargo, la expresión de estas proteínas óseas no colágenas no se ha informado en las arterias musculares en la literatura veterinaria.

Nuestros resultados también mostraron sobreexpresión de fosfatasa alcalina no tejido específica en áreas extensas de calcificación arterial medial. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que la fosfatasa alcalina no específica de tejido activada por las células del músculo liso vascular actúa degradando el pirofosfato extracelular, creando condiciones bioquímicas favorables para la formación de hidroxapatita y la calcificación del tejido (Bobryshev et al. 2014). El depósito de minerales y la transdiferenciación de las células musculares lisas arteriales en células osteogénicas son mecanismos dependientes de la fosfatasa alcalina no tejido específica relacionados con la calcificación arterial (Zhu et al. 2015). La fosfatasa alcalina no tejido específica es ubicua en múltiples tejidos y también se expresa en todas las capas de la carótida de la oveja control (Liedtke et al. 2020; Orris, 2020).

La interacción de los receptores de vitamina D de las células musculares lisas arteriales con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desencadena la modulación de la expresión y transcripción de genes, así como la desdiferenciación, proliferación, migración y transdiferenciación celular (Wang et al. 2012; Franczyk et al. 2014). Similar a lo descrito por Vasconcelos et al.

(1998), la expresión del receptor de vitamina D se identificó en el endotelio y en todas las capas vasculares de las ovejas intoxicadas estudiadas,

En nuestro estudio, los hallazgos ultraestructurales arteriales proporcionaron evidencia de cambios en el fenotipo de las células musculares lisas arteriales debido al aumento del aparato secretor celular. Además, los cambios morfológicos también mostraron el papel de las vesículas matriciales y la liberación de exosomas por las células musculares lisas arteriales en el proceso inicial de calcificación de la capa media. El sitio inicial de calcificación arterial iniciado por vesículas matriciales y exosomas, como se observa en ovejas con CE, es semejante al proceso de calcificación en tejidos óseos a través de condrocitos y osteoblastos (Reynolds et al. 2004; Shroff et al. 2010). Las células musculares lisas arteriales pueden diferenciarse en un fenotipo sintético, osteoblastos, condrocitos, adipocitos y macrófagos con propiedades de remodelación de la matriz, proliferación y migración (Sinha et al. 2014; Durham et al. 2018).

Los eventos celulares, como cambios fenotípicos, proliferación, migración y producción de vesículas matriciales por las CMLAs, observados en este estudio, también se han observado en conejos intoxicados por *Solanum glaucophyllum* (Barros et al. 1981) y en ovejas con CE causada por *Nierembergia veitchii* (Vasconcelos et al. 1998). Se informó un aumento sustancial del aparato sintético y una reducción sustancial de elementos contráctiles en las CMLAs en comparación con las CMLAc (Vasconcelos et al. 1998).

Las vesículas matriciales detectadas en la túnica media de ovejas con CE son cuerpos extracelulares rodeados por una membrana polarizada (Kapustin et al. 2015; Zazzeroni et al. 2018). Las CMLAs producen vesículas matriciales que seleccionan proteínas de membrana y lípidos con afinidad por la mineralización (Anderson 2007). La mineralización extracelular se inicia en las vesículas matriciales y los exosomas liberados por las CMLAs (Kapustin et al. 2015; Kapustin y Shanahan, 2016; Liberman y Marti, 2017) y ocurre en dos fases en las calcificaciones tanto fisiológicas como patológicas (Anderson, 2007). La primera fase comprende el desarrollo temprano de cristales de hidroxapatita dentro de las vesículas matriciales y la liberación de exosomas y fosfatos libres a través de proteínas y fosfolípidos que se unen al calcio, principalmente por la actividad de la fosfatasa alcalina no tejido específica. Los altos niveles de estos elementos superan las propiedades de solubilidad, lo que permite la deposición de hidroxapatita en la superficie interna de la vesícula. En la segunda fase, se produce la nucleación, el depósito y el aumento de la biosíntesis de la hidroxapatita de cristales más grandes, que ocupan el espacio extracelular (Anderson, 2007). Los niveles homeostáticos de calcio y fosfato en el líquido extracelular son suficientes para promover el desarrollo de cristales de hidroxapatita (Howell et al. 1976).

Los nódulos calcificados observados en la superficie íntima de la lámina elástica interna, previamente reportados por Vasconcelos et al. (1998), son probablemente exosomas mineralizados liberados por CMLAs mediales y transportados mecánicamente por células migratorias.

Al analizar el conjunto de hallazgos histopatológicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales en ovejas con CE, detectamos cambios marcados en la media y la íntima caracterizados por el cambio de CLMAc en CMLAs, sobreexpresión de proteínas óseas no colágenas y fosfatasa alcalina no tejido específica y calcificación en medios relacionados con la presencia de vesículas de matriz y exosomas. Desde esta perspectiva, planteamos la hipótesis de que la ausencia de vesículas de matriz y exosomas en la hiperplasia de la íntima explica la falta de calcificación local incluso en presencia de proteínas óseas no colágenas y expresión de fosfatasa alcalina no tejido específica. Los hallazgos ultraestructurales sugirieron el papel crucial de las vesículas matriciales y los exosomas en el desarrollo de la calcificación vascular en ovejas con CE. La explicación de la falta de vesículas matriciales y la producción de exosomas por las CMLAs en la hiperplasia de la íntima queda por dilucidar.

Las observaciones de este estudio sugieren que existen dos tipos genéticamente diferentes de CMLAs: un tipo que, después de la desdiferenciación, migra de la media a la íntima y sufre hiperplasia sin calcificación de la matriz y un segundo tipo que permanece en la túnica media, libera vesículas matriciales y exosomas libres, produce una matriz extracelular calcificable y, posteriormente, sufre transdiferenciación y metaplasia ósea y cartilaginosa.

Los resultados de este estudio en asociación con los de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Barros et al. 1970; Barros et al. 1981; Vasconcelos et al. 1998; Barros y Gimeno, 2000; Barros et al. 2006; Machado et al. 2020) sugieren un complejo proceso de calcificación causado por plantas calcinogénicas: el principio tóxico se une a los receptores de vitamina D de las células musculares lisas arteriales y promueve cambios morfológicos a través de la expresión de secuencias genéticas desconocidas. El principio tóxico promueve eventos de conversión del fenotipo celular, tales como desdiferenciación, transdiferenciación y metaplasia de las células musculares lisas arteriales; producción de vesículas matriciales y exosomas; y expresión de proteínas óseas no colágenas y fosfatasa alcalina no tejido específica, lo que da como resultado la calcificación medial de las arterias musculares. Son necesarios más estudios para dilucidar por completo la compleja patogénesis de la calcificación arterial en la CE.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay (Proyecto CL 44) y a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil, (Código de Finanzas 001), por el financiamiento parcial del estudio. Un agradecimiento especial al Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva (Universidade Federal Rural de Pernambuco-Campus Garanhuns) por la provisión de un control negativo de las arterias carótidas en medio de la pandemia de SARS-Cov-2.

8. CAPÍTULO 3: CALCINOSIS ENZOÓTICA EN OVINOS EN URUGUAY

Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6766>.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es reportar dos brotes de intoxicación por *Nierembergia rivularis* en ovinos en Uruguay. Los brotes ocurrieron en predios ubicados en una isla (brote A) y en el borde (brote B) del lago Rincón del Bonete. Fueron afectados ovinos de todas las edades, con excepción de los corderos lactantes. Los primeros signos clínicos fueron observados a principios de octubre, y las muertes ocurrieron entre diciembre y febrero. En los dos brotes la morbilidad fue del 10% y la mortalidad fue de 7,2% y 3,1% en los brotes A y B, respectivamente. Los signos clínicos incluyeron pérdida de peso, abdomen retraído, andar rígido y cifosis. Se realizó necropsia en una oveja de cada brote. Se observaron calcificación pulmonar y arterial, nefrocalcinosis y osteopetrosis en exámenes macro y microscópicos en ambos ovinos. En el ovino A se observó hiperplasia y carcinoma de células C de la tiroides. El ovino B mostró hiperplasia de células C de la tiroides y atrofia de células principales de la paratiroides. No se examinó la paratiroides en el ovino A. El diagnóstico diferencial de calcinosis enzoótica en el sur de Sudamérica debe tener en cuenta cuatro plantas tóxicas de la familia Solanaceae: *Solanum glaucophyllum*, *Solanum stuckertii*, *Nierembergia veitchii* y *Nierembergia rivularis*.

Palabras clave: enfermedades de ovinos, calcinosis enzoótica, *Nierembergia*, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

La intoxicación por plantas calcinogénicas produce calcificación sistémica de tejidos blandos en diferentes especies animales. Las plantas que se sabe que son calcinogénicas en Sudamérica (Argentina, Brasil y Uruguay) son *Solanum glaucophyllum* (anteriormente *Solanum malacoxylon*), que afecta los bovinos (Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1975; Gimeno 2001), ovinos (García y Santos et al. 2007), búfalos (Santos et al. 2011) y equinos (Odriozola et al. 2017); *Solanum stukertii*, que afecta caprinos en Argentina (Iglesias et al. 2008; Rossanigo et al. 2017); *Nierembergia veitchii* (Barros et al. 1970; Riet-Correa et al. 1987; Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009) y *Nierembergia rivularis* (sinónimo *Nierembergia repens*) (García y Santos et al. 2012), que afectan a ovinos. *Nierembergia veitchii* raramente afecta, bovinos en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Riet-Correa et al. 1987). En el Brasil Central se ha notificado calcinosis enzoótica (CE) de causa desconocida afectando a ovinos, caprinos y bovinos (Guedes et al. 2011).

Nierembergia rivularis (Solanaceae) es una planta rastrera que presenta crecimiento vegetativo entre octubre a marzo (primavera y verano), de hojas simples, glabras y redondeadas de color verde con 2-3,5 cm de ancho y 1-1,5 cm de largo con tallos delgados

y flores blancas. Esa especie puede ser encontrada en zonas húmedas del Uruguay (Lahite et al. 1997).

Intoxicación en ovinos por *Nierembergia rivularis* ocurre en áreas húmedas en la región de Batoví, departamento de Tacuarembó, Uruguay, desde 1989 (Mederos et al. 1991), cerca de áreas inundadas en el departamento de Rivera (García y Santos et al. 2012), en las islas del lago Rincón del Bonete (departamento de Durazno) y a lo largo de los bordes del mismo lago en el departamento de Tacuarembó (Preliasco et al. 2014). La intoxicación ocurre entre octubre (primavera) y marzo (verano) con una mortalidad del 5-24% (Tabla 1) y afecta a ovinos de todas las edades, con excepción de los corderos lactantes (Mederos et al. 1991; García y Santos et al. 2012; Preliasco et al. 2014). Se reprodujo experimentalmente calcinosis enzoótica en ovinos que pastorearon durante tres meses en un potrero de 625 m² infestado por *Nierembergia rivularis* (García y Santos et al. 2012).

Los casos de CE en ovinos en Rio Grande do Sul, Brasil, fueron descritos inicialmente por Barros et al. (1970); posteriormente, la intoxicación se reprodujo mediante la administración experimental de *Nierembergia veitchii* a conejos (Riet-Correa et al. 1981) y ovinos (Riet-Correa et al. 1993). La enfermedad se ha descrito principalmente en las zonas montañosas del Planalto Medio en el sur del Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al. 1987; Barros et al. 1992). En cambio, *Nierembergia rivularis* se presenta principalmente en zonas bajas y húmedas del Uruguay (Figura 1) (García y Santos et al. 2012; Preliasco et al. 2014).

Las intoxicaciones por *Nierembergia veitchii* y *Nierembergia rivularis* afectan a ovinos de todas las edades de octubre a marzo, con la excepción de los corderos lactantes. Se ha detectado un aumento de la calcemia en octubre, que alcanza su punto máximo en febrero y disminuye a partir de marzo (Riet-Correa et al. 1987). A pesar de la baja letalidad de la CE causada por *Nierembergia veitchii* (1-25%), la morbilidad puede estar en el rango de 1-80%, lo que resulta en pérdidas subestimadas ya que la mayoría del rebaño afectado sufre una pérdida de peso que puede ser confundida con desnutrición o infecciones parasitarias (Riet-Correa et al. 1987; Barros et al. 1992).

En el Uruguay se notificó un brote de intoxicación por *Solanum glaucophyllum*, que contiene 1,25(OH)₂D₃, en ovejas criadas cerca a los arroyos Solís Chico y Mosquito, departamento de Canelones, en el que murieron 15 ovejas de un rebaño de 100 ovejas de diferentes edades (García y Santos et al. 2007). La intoxicación por *Solanum glaucophyllum* se ha descrito anteriormente en bovinos de los departamentos de Canelones, Colonia, Rocha (Riet-Correa et al. 1975) y Paysandú (Rivero et al. 1989). En Rocha, la CE se produce entre noviembre y febrero en una zona húmeda de aproximadamente 110.000 hectáreas, con una morbilidad que oscila entre el 2% y el 80% con una media del 8% al 10% (Riet-Correa et al. 1975). Sin embargo, desde 1975, la mayoría de las zonas de húmedas se han secado para el cultivo de arroz, lo que ha reducido la distribución y la frecuencia de la intoxicación en el departamento de Rocha (Franklin Riet-Correa, datos no publicados).

La calcinosis enzoótica es una enfermedad crónica en los ovinos se caracteriza clínicamente por anorexia, pérdida de peso, rigidez de la marcha y cifosis con hipercalcemia e hiperfosfatemia (Barros et al. 1970; Riet-Correa et al. 1987). Intolerancia al ejercicio y muerte súbita, causada por edema pulmonar agudo, se observan durante las prácticas de manejo (baño, esquila y dosificación) del rebaño (Mederos et al. 1991; Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009; Preliasco et al. 2014). Calcificación de los tejidos blandos, hiperplasia de las células C de la tiroides, atrofia de las células principales de la paratiroides, osteonecrosis y osteopetrosis son las principales alteraciones observadas en ovinos intoxicados por *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1987, Riet-Correa et al. 1993) y *Nierembergia rivularis* (García y Santos et al. 2012). *Nierembergia veitchii* tiene un principio tóxico con una actividad biológica similar a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Riet-Correa et al. 1987).

En el presente trabajo se describen los hallazgos epidemiológicos, clínicos y patológicos de dos brotes de CE en ovinos asociados al consumo espontáneo de *Nierembergia rivularis* ocurridos en Uruguay en los años 2016 y 2018.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron datos epidemiológicos y clínicos de los productores y veterinarios de dos predios ubicados en los departamentos de Durazno y Tacuarembó (Uruguay). Se realizó la evaluación clínica y la toma de muestras de sangre para la cuantificación de la concentración sérica de calcio y fósforo en un ovino del brote A y 13 ovinos del brote B. Se realizó la necropsia de una ovino del brote A (Ovino A) que murió espontáneamente y de una ovino del brote B (Ovino B) que fue sometida a eutanasia. Se tomaron muestras de órganos, incluidos fragmentos de la epífisis y diáfisis del fémur, que se fijaron en formalina tamponada al 10% (pH 7,0), se procesaron de forma rutinaria, se cortaron a 4 μm , se tiñeron mediante la técnica de la hematoxilina y la eosina (HE) y se evaluaron histológicamente. Las muestras del fémur se descalcificaron con ácido nítrico al 7%. Muestras de *Nierembergia* sp. se identificaron como *Nierembergia rivularis* Miers (sinónimo *Nierembergia repens* Ruiz & Pav) (Cabrera 1979) y se depositaron bajo el número MVFA 34988 en el herbario Ing. Agr. Bernardo Rosengurtt, en la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República en Montevideo, Uruguay. Con el software Quantum Gis 2.14® se construyó un mapa que muestra la distribución y localización de los casos de intoxicación por *Nierembergia rivularis*.

RESULTADOS

Epidemiología y signos clínicos

El brote A ocurrió en febrero de 2016 en un predio de 50 hectáreas ubicado en una isla del lago Rincón del Bonete, departamento de Durazno. En un rebaño de 110 ovinos, 11 animales (10%) mostraron signos clínicos y ocho (7,2%) murieron. No había bovinos en el

predio. El brote B ocurrió en enero de 2018 en predio cercano al lago Rincón del Bonete, región Cardozo, departamento de Tacuarembó. La enfermedad se presentó en un potrero de 90 hectáreas en el borde del lago en el que pastaban 220 ovejas y 70 bovinos. Veinte ovinos (10%) presentaban signos clínicos. Cuatro vacas presentaron signos clínicos semejantes a los observados en ovinos, pero en esta especie no se registran muertes. Ovinos de diferentes edades estaban afectados, con la excepción de los corderos lactantes. Siete ovinos (3,1%) murieron entre diciembre y febrero (verano), dos a cinco meses después de la aparición de la enfermedad en primavera. Hiperfosfatemia (8,5 mg/dL - valores de referencia: 5,0-7,3 mg/dL) fue observada en el Ovino B que fue necropsiado. Se observaron niveles normales de calcio y fósforo en los otros animales examinados. La muestra de la oveja A no se examinó debido a la hemólisis.

Los animales de ambos predios fueron criados en los bordes del lago Rincón del Bonete (Figura 2) en potreros infestados por *Nierembergia rivularis*, donde permanecían durante todo el año. Los signos clínicos observados eran pérdida de peso progresiva, abdomen retraído, cifosis (Figura 3A), marcha rígida, intolerancia al ejercicio, debilidad y decúbito. Cuando se los movilizó, algunos ovinos presentaron una manifestación clínica aguda con dificultad para respirar, taquipnea, edema pulmonar y decúbito que posteriormente progresó hasta la muerte. Desde 2012 ocurrían brotes anuales en el predio A y desde 2011 en el predio B.

Lesiones macroscópicas e histológicas

Los cadáveres estaban flacos y mostraban una calcificación generalizada de los tejidos blandos. Las arterias musculares y elásticas estaban difusamente rígidas, con una marcada pérdida de elasticidad. La superficie de la íntima era irregular con múltiples placas intramurales blancas, prominentes y multifocales a coalescentes (Figura 3B). Las válvulas aórticas bicúspide y semilunar exhibían placas similares que también se identificaron en las cuerdas tendinosas y endocárdicas. Los pulmones no se colapsaron y mostraron calcificación multifocal, principalmente en el lóbulo caudal. Los riñones exhibían estrías blanquecinas, opacas, lineales y radiales en la unión cortico medular (Figura 3C). Había marcado engrosamiento del hueso cortical con reducción del espacio medular de los huesos largos.

Histológicamente, la íntima de la arteria carótida presentaba una hiperplasia no mineralizada (Figura 3D) de intensidad variable, con pérdida de la ondulación de la lámina elástica interna. Extensas zonas de depósito irregular de material basófilo (calcificación) expandían y desorganizaban la capa media, a veces con islas de metaplasia ósea y cartilaginosa, además de un discreto infiltrado de macrófagos. Una fina capa de células musculares lisas de la túnica media, adyacentes a la adventicia, permanecían sin cambios. La túnica media y la íntima de la aorta exhibían depósitos minerales similares.

Tabla 1: Brotes de calcinosis enzoótica reportados en Uruguay (1989-2013)

DEPARTAMENTOS	MESES/AÑO	PLANTAS	OVINOS		REFERENCIAS
			Total	Mortalidad %	
Tacuarembó	Oct/1989	<i>N. rivularis</i>	-	6	Mederos et al. 1991
Rivera	Dic/2005-Feb/2006	<i>N. rivularis</i>	200	6 (12/200)	García y Santos et al. 2012
Tacuarembó	Oct/2012-Mar/2013	<i>N. rivularis</i>	199	5 (10/199)	Preliasco et al. 2014
Tacuarembó	Oct/2012-Mar/2013	<i>N. rivularis</i>	400	12,5 (50/400)	Preliasco et al. 2014
Durazno	Oct/2012-Mar/2013	<i>N. rivularis</i>	250	24 (60/250)	Preliasco et al. 2014
Canelones	Ag-Dic/2006	<i>S. glaucophyllum</i>	100	15 (15/100)	García y Santos et al. 2007

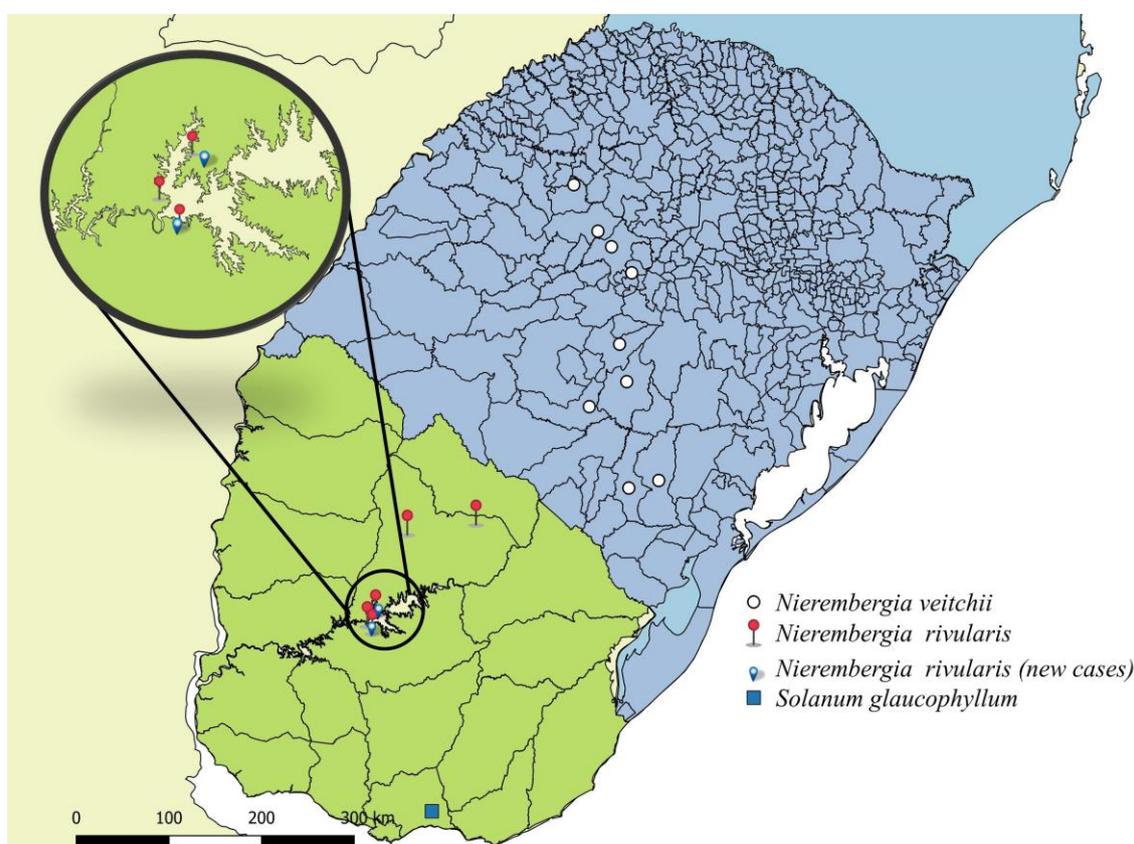


Figura 1. Ubicación y distribución geográfica de los brotes de calcinosis enzoótica en ovinos intoxicados por *Nierembergia rivularis* en Uruguay y *Nierembergia veitchii* en Rio Grande do Sul (RS), Brasil. La enfermedad se produce principalmente en zonas húmedas de los departamentos de Tacuarembó, Rivera y Durazno (Uruguay) y en zonas altas del Planalto Medio (RS), Brasil. Destaque: bordes del lago Rincón del Bonete, donde ocurrieron los dos brotes descritos en la presente investigación y otros tres anteriormente notificados.



Figura 2. Localización de los brotes de calcinosis enzoótica en ovinos causados por *Nierembergia rivularis* en Uruguay. Brote A. (A) El borde del lago Rincón del Bonete está invadido por la planta. (B) Campo natural invadido por *Nierembergia rivularis*. (C) Detalles de la planta con flor.

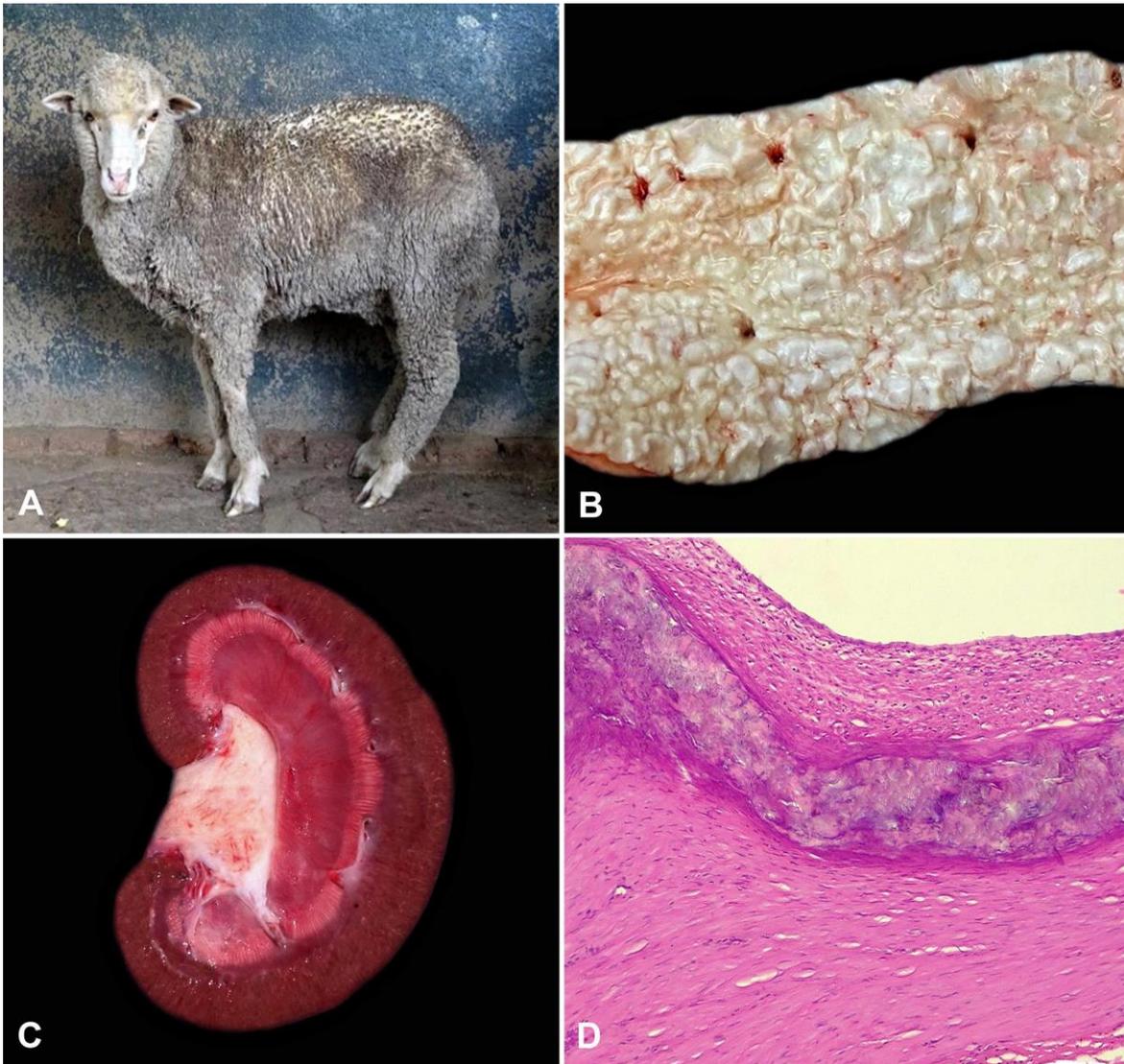


Figura 3. Calcinosis enzoótica en ovinos causada por *Nierembergia rivularis* en Uruguay. Brote B. **(A)** Ovino presentando cifosis, abdomen retraído, mala condición corporal y miembros arqueados. **(B)** Aorta. Superficie de la íntima difusamente irregular con extensas placas calcificadas. **(C)** Riñón. Nefrocalcinosis caracterizada por estriaciones blancas dispuestas radialmente en la junción corticomedular. **(D)** Arteria carótida. Hiperplasia moderada de la capa íntima y calcificación de la capa media. HE, obj.10x.

La calcificación leve a marcada de los septos alveolares sustituyó ocasionalmente el parénquima pulmonar por zonas densas de calcificación con metaplasia ósea y cartilaginosa. La calcificación también se verificó en los riñones, afectando el lumen tubular distal, las arteriolas y el intersticio. Se observó hiperplasia de células C y carcinoma de la tiroides en el ovino A (Machado et al. 2020). El Ovino B mostró hiperplasia de las células C de la tiroides y atrofia de las células principales de la paratiroides. La paratiroides no se examinó en el ovino A. En los huesos largos había engrosamiento de la cortical con reducción del espacio medular y disminución de los canales de Havers. El hueso trabecular de la epífisis y diáfisis presentaba trabéculas engrosadas revestidas por osteoclastos y osteoblastos escasos. La superficie articular

proximal de la cabeza del fémur mostraba, multifocalmente, condrocitos desorganizados y degenerados y presentaba áreas de calcificación.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de intoxicación por *Nierembergia rivularis* en ovinos, en ambos brotes, fue basado en los hallazgos epidemiológicos, clínicos y patológicos, además de la presencia de la planta en los pastos. Estos hallazgos fueron similares a los descritos anteriormente en los casos de CE (Barros et al. 1970; 1992, Riet-Correa et al. 1987; Mello, 2003). Ambos productores informaron de la muerte repentina de algunas ovejas, que ocurren por edema pulmonar agudo debido la calcificación de las válvulas cardiacas (Barros et al. 1992; Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009).

La mortalidad observada en ambos brotes (3,1% y 7,2%), que fue similar a las tasas notificadas anteriormente (5-24%) (Mederos et al. 1991; García y Santos y et al. 2012; Preliasco et al. 2014), causó importantes pérdidas a los productores. Además, hay que considerar las pérdidas económicas en los ovinos que no presentaron signos clínicos (Riet-Correa et al. 1987). Por lo tanto, la intoxicación por *Nierembergia rivularis* causa importantes pérdidas económicas en zonas con potreros ubicados en los límites de las islas del lago Rincón del Bonete, así como en áreas húmedas cercanas a los arroyos de los departamentos de Tacuarembó y Rivera (Mederos et al. 1991; García y Santos et al. 2012; Preliasco et al. 2014).

Sólo una de las ovejas examinadas presentaba hiperfosfatemia, y las concentraciones séricas de Ca estaban dentro de los valores de referencia. La hipercalcemia y la hiperfosfatemia son alteraciones comunes en la intoxicación por vitamina D (Mello, 2003); también ocurre en bovinos intoxicados espontáneamente por *Trisetum flavescens* (Köhler & Libiseller, 1970) y *Cestrum diurnum* (Durand et al. 1999), así como en la intoxicación experimental por *Solanum glaucophyllum* en bovinos (Döbereiner et al. 1971) y *Nierembergia veitchii* en ovinos (Riet-Correa et al. 1993).

Se ha descripta hipercalcemia sin hiperfosfatemia en caballos (Krook et al. 1975a) y en bovinos (Krook et al. 1975b) intoxicados por *Cestrum diurnum* y en ovinos intoxicados por *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1987). Ocurre, también, hiperfosfatemia sin hipercalcemia en bovinos intoxicados por *Trisetum flavescens* (Diksen et al. 1970) y en ovejas intoxicadas por *Nierembergia rivularis* (Preliasco et al. 2014). En cambio, se ha comprobado que bovinos intoxicados naturalmente por *Solanum glaucophyllum* no presentaran alteraciones (Döbereiner et al. 1971). Las investigaciones de Döbereiner et al. (1971) sugirieron que los animales con CE con niveles séricos normales de Ca y P no habían consumido la planta calcinogénica días antes de la recolección de sangre. El aumento de las concentraciones de Ca y P es evidente en los animales poco después del consumo de las plantas y durante la exposición experimental (Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1993). El producto de los valores de Ca x P permite una mejor evaluación de su metabolismo (Gimeno 2001) y ha sido indicado para el diagnóstico de

casos subclínicos de CE. Considerados en conjunto, estos resultados demuestran que un aumento de Ca o P por sí solo o la ausencia de alteraciones en las concentraciones séricas de estos minerales no excluye el diagnóstico de CE.

Para prevenir y controlar la intoxicación, cabe señalar que la intoxicación por *Nierembergia rivularis* y *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1987; Rissi et al. 2007; Rissi et al. 2009) es estacional y coincide con el crecimiento vegetativo de la planta, lo que da lugar a la aparición de signos clínicos en la primavera y a una mayor mortalidad durante el verano. No existe un tratamiento para la intoxicación por plantas calcinogénicas, y la reversibilidad de las lesiones es limitada. Cuando se los traslada a pastizales libres de la planta, los animales pueden mostrar una ligera recuperación en el aumento de peso, disminuyendo parcialmente las pérdidas económicas (Barros et al. 1992). Por lo tanto, se recomienda que inmediatamente después de los primeros signos o al comienzo de la primavera, las ovejas se trasladen a potreros libres o con bajas cantidades de *Nierembergia rivularis*. La estacionalidad de la enfermedad y la presencia en humedales en campos bajos a lo largo de los bordes de lagos y ríos permite el uso del pastoreo rotativo, con una permanencia de corta duración en potreros muy infestados como medida recomendada de control de la enfermedad.

Como la mayoría de las plantas de *Nierembergia rivularis* de ambos brotes se encontraban en las zonas próximas al agua, la planta podría controlarse utilizando herbicidas en zonas restringidas. Recientemente, se probaron varios herbicidas dentro del grupo de las auxinas sintéticas y los inhibidores de la acetolactato sintasa para controlar *Nierembergia rivularis*. A corto plazo, el control de la biomasa aérea fue eficiente (más del 95%) con mezclas de 2,4-D + Metsulfuron; 2,4-D + Starane; o 2,4-D + Lexus. Sin embargo, en el siguiente período vegetativo, aunque en menor grado, continuó la infestación de esta especie. El control a medio y largo plazo fue mucho mejor cuando, además de la aplicación de herbicidas, se evitó el continuo sobrepastoreo de la zona tratada, para favorecer la competencia de las especies forrajeras de interés. La recomendación química consiste en la aplicación de 2 litros de 2,4-D más 200 cc de Tordon más 10 g de Metsulfuron por hectárea con el fin de lograr un buen control a corto plazo y mantener un control residual a medio plazo. Sin embargo, para evitar la reaplicación anual de herbicidas, es necesario ajustar el manejo del pastoreo (Alejandro García, 2020, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA, Uruguay, Comunicación personal).

Los bovinos son menos afectados por la intoxicación por *Nierembergia veitchii* que los ovinos debido a los diferentes hábitos de alimentación de ambas especies y a las características morfológicas de la planta (Riet-Correa et al. 1987). En el presente estudio, en el brote B, el ganado que pastaba en el mismo potrero que las ovejas desarrolló signos clínicos que sugerían el diagnóstico de CE. Es necesario realizar más estudios en las zonas de cría de ganado vacuno invadidas por *Nierembergia rivularis* para confirmar la presencia y la importancia de la CE en esta especie.

El diagnóstico diferencial de la CE en ovinos incluye la paratuberculosis, que es una enfermedad crónica debilitante que afecta a las ovejas y se caracteriza por pérdida progresiva de peso, intolerancia al ejercicio y, ocasionalmente, diarrea (Giannitti et al. 2018). Sin embargo, la enteritis granulomatosa observada histológicamente y la aparición de diarrea en algunos casos de paratuberculosis ayudan a diferenciar estas enfermedades. Las parasitosis gastrointestinales, principalmente la haemoncosis, que ocurre con frecuencia en primavera y verano, también deben considerarse en el diagnóstico diferencial.

CONCLUSIONES

La intoxicación por *Nierembergia rivularis* en Uruguay es una enfermedad crónica que afecta ovinos, y que a veces causa muerte súbita debido a edema pulmonar agudo inducido por insuficiencia cardíaca. Causa pérdidas económicas en majadas de ovinos en áreas húmedas cercanas de ríos o arroyos en los departamentos de Tacuarembó y Rivera y en las islas del lago Rincón del Bonete. Al igual que otras plantas calcinogénicas, *Nierembergia rivularis* causa calcificación de los tejidos blandos (calcinosis enzoótica). La única medida preventiva es evitar que las ovejas pasten durante largos períodos, de octubre a febrero, en los potreros invadidos por la planta.

9. CAPÍTULO 4: HIPERPLASIA Y CARCINOMA DE CÉLULAS PARAFOLICULARES EN OVINO INTOXICADO POR *Nierembergia rivularis*

Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11795>.

RESUMEN

Calcinosis enzoótica, causada por *Nierembergia rivularis* en Uruguay y *Nierembergia veitchii* en Brasil, es una enfermedad caracterizada por mineralización de tejidos blandos, hiperplasia de las células parafoliculares de la tiroides, y aumento de los niveles séricos de calcio y fósforo. Se describe un caso de hiperplasia y carcinoma de células foliculares bilateral en un ovino de cuatro años, con calcinosis enzoótica asociada a la intoxicación por *Nierembergia rivularis*. El diagnóstico de hiperplasia y carcinoma de células parafoliculares fue confirmado por las marcaciones inmunohistoquímicas para péptido relacionado con el gene de la calcitonina y enolasa neuronal específica. La hiperplasia es una lesión preneoplásica inducida por hipercalcemia. Se sugiere que la hipercalcemia crónica causada por la intoxicación por *N. rivularis* puede haber inducido a la hiperplasia seguida de transformación en carcinoma de las células parafoliculares. Los efectos carcinogénicos de las plantas calcinogénicas en el sistema endócrino tienen que ser mejor estudiadas.

Palabras clave: Enfermedades de ovinos, neoplasia, plantas calcinogénicas, plantas tóxicas, sistema endócrino.

INTRODUCCIÓN

Calcinosis enzoótica (CE), en rumiantes es causada por la ingestión de plantas calcinogénicas como el *Solanum glaucophyllum* (sinónimo *Solanum malacoxylon*) (Mello, 2003), *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1987) y *Nierembergia rivularis* (sinonimia *Nierembergia repens*) en América del Sur (García y Santos et al. 2012), *Cestrum diurnum* en la América del Norte, *Trisetum flavescens* en Europa, y *Solanum torvum* en Oceanía (Mello, 2003). *Solanum glaucophyllum* y *Cestrum diurnum* tienen 1,25(OH)₂D₃ (calcitriol) (Wasserman et al. 1976; Mello, 2003). El metabolito tóxico de la *N. rivularis* es desconocido y *N. veitchii* presenta efecto biológico semejante a la actividad del calcitriol (Riet-Correa et al. 1987).

La intoxicación por plantas calcinogénicas produce alteraciones en el metabolismo del calcio y fósforo, como la hipercalcemia e hiperfosfatemia, mineralización de tejidos blandos, hiperplasia de las células parafoliculares (C) de la tiroides, atrofia de la paratiroides y osteopetrosis (Riet-Correa et al. 1987). La hiperplasia de las células parafoliculares en casos de CE es inducida por la hipercalcemia, que es el principal estímulo para la producción de calcitonina, la hormona producida por esas células para reducir los niveles plasmáticos de calcio (Riet-Correa et al. 1987).

Por lo tanto, la hiperplasia de las células C es una lesión preneoplásica inducida por hipercalcemia que puede transformarse en neoplasia (Rosol & Grone, 2015). La transformación para neoplasia maligna no ha sido descrita en casos de CE. En este trabajo presentamos los hallazgos patológicos e inmunohistoquímicos de un caso de hiperplasia de las células C de las tiroides y carcinoma en un ovino con CE causada por *Nierembergia rivularis*.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

En febrero de 2016, un brote de CE fue diagnosticado en un predio ubicado en una isla del lago del Rincón del Bonete, en el departamento de Durazno, Uruguay. De una majada de 110 ovinos, ocho murieron después de presentar pérdida de peso crónica, marcha rígida e intolerancia al ejercicio por 2-4 meses. Gran cantidad de *Nierembergia sp.* fue encontrada en las márgenes del lago. Ejemplares de la planta fueron identificadas como *Nierembergia rivularis* (sinonimia *Nierembergia repens* Ruiz & Pav), identificadas por el código MFVA 34988 en el Herbario “Ing. Agr. Bernardo Rosergurt” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

Un ovino de cuatro años, que presentaba severo adelgazamiento, fue autopsiado. La aorta abdominal y torácica, la carótida interna y las coronarias estaban difusamente rígidas, con pérdida de elasticidad y superficie irregular debido a múltiples formaciones en placas, irregulares, intramurales, blancas y firmes. Fue observada mineralización de las válvulas bicúspide y semilunar aórtica y de las cuerdas tendinosas del corazón. En los pulmones, los lobos caudales no estaban colapsados y se observaba mineralización del parénquima. Había estriaciones lineares, blancas y paralelas por toda la región cortico medular del riñón. La tiroides presentaba nódulos múltiples, coalescentes, blancos, con 3-10 mm, con bordes indistintos que se expandían por el parénquima (Figura 1).

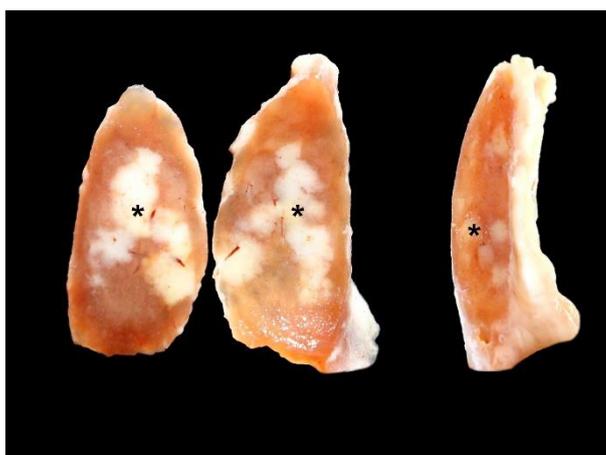


Figura 1: Ovino intoxicado por *Nierembergia rivularis*. Tiroides. Hiperplasia y carcinoma de las células parafoliculares. Se observan múltiples nodulaciones, coalescentes, blancas, y con bordes irregulares en el parénquima (*).

Los hallazgos histológicos consistían en mineralización de tejidos blandos, principalmente en la capa media de la aorta y coronarias, septos alveolares del pulmón, arteriolas y túbulos renales. En las arterias, también se observaba hiperplasia de la capa íntima. La tinción de Von Kossa evidenció depósitos de calcio en las arterias, pulmón, y riñón. Además, las tiroides presentaban extensa desorganización de la arquitectura del tejido por masas multinodulares, no encapsuladas, con proliferación moderada a acentuada de células epiteliales organizadas en grupos, y entrelazadas con tejido fibrovascular (Figura 2A). Las células neoplásicas eran redondeadas o poligonales, con citoplasma moderado e indistinto y el núcleo redondo u oval, centralizado o marginalizado, con cromatina grosera y 1-2 nucleolos. Se observaba moderada anisocitosis y anisocariosis. En áreas con alta celularidad, se veían células fusiformes, y ocasionalmente cariomegalia, con cromatina vesicular, y/o invaginaciones del núcleo. Por veces, las células neoplásicas estaban retraídas, con citoplasma hipereosinofílico, y el núcleo en picnosis o cariorexis (Figura 2B).

La proliferación celular benigna y maligna comprimía parcial o totalmente los folículos de la tiroides, y ocasionalmente rompía la membrana basal. Multifocalmente en esas áreas, el infiltrado de células estaba separado por material fibrilar eosinofílico (colágeno), evidenciado por la tinción de Tricrómico de Gomori. Raramente, alrededor de un material amorfo, homogéneo, extracelular y eosinofílico, negativo para la tinción de Rojo Congo, se veían células neoplásicas. Se encontró menos de una figura de mitosis en 10 campos, de mayor aumento (400x). En las áreas con el parénquima bien preservado, había hiperplasia difusa de células parafoliculares.

Se realizó inmunohistoquímica para calcitonina, péptido relacionado con el gene de la calcitonina (PRGC), enolasa neuronal específica (ENE) y cromogranina A (CgA), según los protocolos utilizados en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Minnesota. La proliferación celular se mostró positiva para ENE (Figura 2C), calcitonina (Figura 2D), y negativo para CgA. Ese inmunofenotipo es compatible con células parafoliculares (Okada et al., 1991b). Mientras que la mayoría de las células proliferadas mostró fuerte y granular marcación citoplasmática para calcitonina, en otras, la marcación fue mínima o no detectable, sugiriendo indiferenciación celular, que también apoya el diagnóstico de malignidad (Wasserman et al., 1976). La marcación para ENE fue uniformemente fuerte, difusa, citoplasmática y granular en la mayoría de las células neoplásicas. Además, gran proporción de las células parafoliculares fueron positivas para PRGC, con reactividad nuclear granular difusa.

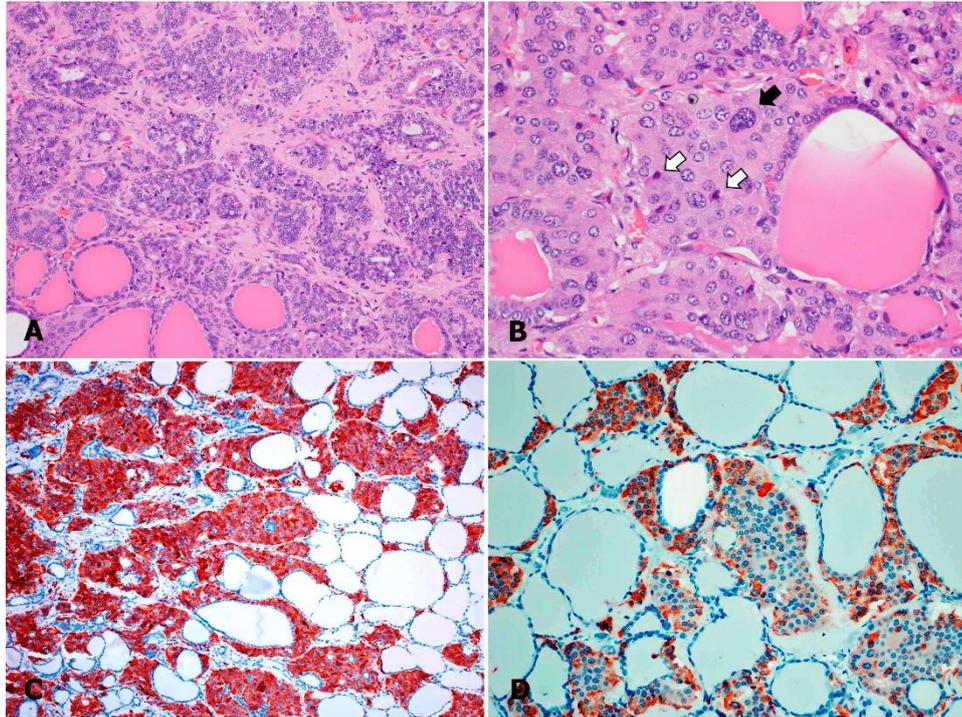


Figura 2: Ovino intoxicado por *Nierembergia rivularis*. Tiroides. Carcinoma de células parafoliculares. **A)** Sección de la tiroides, presentando una masa multilobular, expansiva y no encapsulada, parcialmente delimitada, compuesta por células dispuestas en grupos y paquetes, sustentadas por una cantidad mínima de estroma fibrovascular; H&E, 200x. **B)** Se observa moderada anisocitosis y anisocariosis, con cariomegalia (flecha negra) y células apoptóticas (flechas blancas); H&E, 400x. **C)** Inmunohistoquímica de enolasa neurona específica. Se observa inmunoreactividad citoplasmática difusa, fuerte, granular en células neoplásicas; 200x. **D)** Inmunohistoquímica de calcitonina. Inmunoreactividad citoplasmática granular es evidente en algunas células parafoliculares neoplásicas; 200x.

DISCUSIÓN

Hallazgos clínicos, macroscópicos e histopatológicos encontrados en el ovino son característicos de CE (Riet-Correa et al. 1987). La principal lesión en la CE es la mineralización de la capa media de las arterias. Modulación de la expresión genética es hecha por acción del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y genera diferenciación y síntesis de proteínas óseas por las células musculares lisas vasculares. Las células musculares lisas modificadas producen una matriz extracelular que se mineraliza (Barros et al. 2006).

La majada donde se originó este caso pastoreaba durante 5 a 6 meses, desde finales de primavera hasta principios de otoño, en una pradera natural invadida por *Nierembergia rivularis*. Similar a otras plantas calcinogénicas, la intoxicación por *Nierembergia* spp. induce hipercalcemia e hiperfosfatemia, que a su vez resultan en hiperplasia de las células parafoliculares de la tiroides, atrofia de la glándula paratiroides y osteopetrosis (Riet-Correa et al. 1987; Rosol & Grone, 2015). La hipercalcemia ocurre principalmente por inducción de síntesis de proteínas complejantes de calcio en el tracto intestinal, que

conduce a un aumento de la absorción de calcio y fósforo (Riet-Correa et al. 1987; Mello, 2003).

El aumento de la concentración de calcio en el plasma y fluidos extracelulares es el principal estímulo para la secreción de calcitonina, una hormona reguladora del calcio secretada por las células parafoliculares que reducen el calcio plasmático (Rosol & Grone, 2015). La hiperplasia de las células parafoliculares es una respuesta a la hipercalcemia crónica (Okada et al. 1991b) y puede ocurrir debido a la ingestión de plantas calcinogénicas, ingestión a largo plazo de exceso de calcio (Rosol & Grone, 2015) o, más raramente, como manifestación de hipercalcemia paraneoplásica (hipercalcemia maligna) (Okada et al. 1991a; Rosol & Grone, 2015).

La hiperplasia de las células parafoliculares, inducida por hipercalcemia crónica, es una lesión preneoplásica, que puede progresar a adenoma o carcinoma (Rosol & Grone, 2015). En rumiantes, es descrita en casos naturales y experimentales de CE, incluyendo las intoxicaciones por *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al. 1987), *Cestrum diurnum* y *S. glaucophyllum* (Mello, 2003). Se describió un adenoma de células parafoliculares en una oveja con CE de etiología desconocida (Neumann & Klopfer, 1975). En un estudio, el 30% de los toros alimentados con dietas altas en calcio desarrollaron hiperplasia de células parafoliculares o neoplasia (Rosol y Grone, 2015). Hiperplasia y carcinoma de células parafoliculares ha sido descrito en ovejas con hipercalcemia maligna asociada con linfoma inducido por virus da leucemia bovina (Okada et al. 1991a).

La diferenciación maligna de las células parafoliculares puede resultar de un cambio preneoplásico en respuesta a la hipercalcemia crónica (Wasserman et al. 1976). El patrón histológico de hiperplasia y adenoma no son particularmente diferentes, lo que dificulta el diagnóstico; sin embargo, las características de malignidad presentes en carcinomas, como proliferación celular, infiltración, desorganización, pleomorfismo celular y figuras mitóticas, facilitan el diagnóstico (Wasserman et al. 1976).

Las lesiones variaban de hiperplasia a neoplasia en diferentes secciones y dentro de secciones de la glándula tiroides. Basamos el diagnóstico de carcinoma de células parafoliculares en los siguientes criterios: falta de encapsulación; presencia de áreas altamente celulares; moderado pleomorfismo celular; anisocitosis y anisocariosis que muestran células neoplásicas con cariomegalia y atipia nuclear; e interrupción de la membrana basal folicular con infiltración intratiroidea de células neoplásicas y fibroplasia. El diagnóstico histológico fue confirmado con la inmunohistoquímica.

CONCLUSIONES

En este caso, sugerimos que la hipercalcemia crónica inducida por intoxicación por *Nierembergia rivularis* puede haber llevado a hiperplasia de células parafoliculares y eventual transformación neoplásica, como se describe en otras condiciones asociadas con hipercalcemia crónica en ovinos (Okada et al. 1991a).

10. CONCLUSIONES GENERALES

Los cuatro trabajos que forman esta tesis de doctorado son resultado de trabajos de investigación sobre las calcinosis enzoótica desarrollados en distintos momentos. El primer trabajo es una revisión detallada y actualizada sobre la calcinosis enzoótica y ya está publicado en una revista de impacto. En esta revisión se describen todas las plantas conocidas en diferentes continentes que causan calcinosis enzoótica. Se describen los aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos y toxicológicos de esta enfermedad. Además, se discuten los conocimientos actuales sobre los mecanismos patogénicos de la calcificación de los tejidos blandos.

En el segundo trabajo se hace un estudio retrospectivo y prospectivo de los mecanismos patogénicos de la calcinosis enzoótica causada por *Nierembergia veitchii*. Para esto, se recuperó información (publicada y no publicada) generada mediante microscopía electrónica en la Universidad Federal de Santa María y se complementó con un estudio por inmunohistoquímica. Los resultados de este trabajo sugieren la participación de la fosfatasa alcalina no tejido específica, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, vesículas matriciales y exosomas en el proceso de calcificación arterial en ovinos con calcinosis enzoótica asociada al consumo de *Nierembergia veitchii*. Los hallazgos ultraestructurales demostraron que vesículas matriciales y exosomas son indispensables en el desarrollo del proceso de calcificación, una vez que, ellas estaban siempre presentes en la capa media calcificada y ausentes en la íntima no calcificada. La hipótesis es que la ausencia de vesículas matriciales y exosomas en la capa íntima hiperplásica no posibilita el desarrollo inicial del proceso de calcificación mismo en la presencia de proteínas óseas no colágenas y fosfatasa alcalina no tejido específica. Ese efecto ocurre probablemente por la existencia de dos células musculares lisas sintéticas distintas genéticamente: una que se queda en la media y produce vesículas matriciales y otra que migra para la íntima y no produce estos cuerpos extracelulares.

En el tercer trabajo se hizo una revisión de los brotes anteriores de calcinosis enzoótica en ovinos en Uruguay y se describen dos brotes de intoxicación por *Nierembergia rivularis* ocurridos en una isla del lago del Rincón de Bonete y en las márgenes del mismo lago. La intoxicación por *Nierembergia rivularis* es la más importante causa de calcinosis enzoótica en Uruguay y causa pérdidas económicas importantes. Afecta ovinos y posiblemente bovinos y los brotes ocurren en áreas de campo natural en zonas húmedas de Tacuarembó y Durazno. Las áreas húmedas de los bordes del lago del Rincón del Bonete son un área endémica para dicha enfermedad.

Finalmente se describe un carcinoma de células C de la tiroides en un ovino intoxicado por *N. rivularis*. Este es el primer diagnóstico de este tipo de tumor asociado a la ingestión de una planta calcinogénica. Se propone que el tumor ocurrió en consecuencia de la hipercalcemia generada por la ingestión de la planta. El principio activo de *N. rivularis* no ha sido determinado, pero se sugiere que al igual que otras plantas calcinogénicas posee $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o una sustancia de acción biológica semejante.

11. REFERENCIAS

1. Anderson HC. (2007). The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. *Current Opinion in Orthopaedics*. 18:428–433.
2. Arnold R.M. (1969). The interaction of calcium, magnesium, phosphorus, other minerals and vitamin D in aetiology of Manchester wasting disease. *Trop Anim Health Prod*. 1:75–84.
3. Arnold RM, Fincham IH. (1950). Cardiovascular and pulmonary calcification apparently associated with dietary imbalance in Jamaica. *J Comp Pathol Ther*. 60:51–64.
4. Arnold RM, Fincham IH. (1997). Manchester wasting disease: a calcosinosis caused by a pasture grass (*Stenotaphrum secundatum*) in Jamaica. *Trop Anim Health Prod*. 29:174–176.
5. Barros SS, Driemeier D, Santos MN, Guerrero JAM. (1992). Evolução clínica e reversibilidade das lesões da calcinose enzoótica dos ovinos induzida por *Nierembergia veitchii*. *Pesq Vet Bras*. 12(1/2):5-10.
6. Barros SS, Gimeno EJ. (2000). Cell differentiation and bone protein synthesis in the lung of sheep with spontaneous calcosinosis. *J Comp Pathol*. 123:270–277.
7. Barros SS, Russowisk D, Grando SM. (1996). Ultraestrutura das alterações ósseas na intoxicação experimental por *Solanum malacoxylon* em coelhos. *Pesq Vet Bras*. 16 (2/3):81–86.
8. Barros SS, Santiago C, Pohlez J. (1970). Zur Kalzinose beim Schaf. *Dtsch Tiärztl Wochenschr*. 77:346-349.
9. Barros SS, Soares MP, Gimeno EJ. (2006). Macrophages and giant cell proliferation associated with bone protein synthesis and calcification in the trachea and bronchi of rabbits intoxicated with *Solanum glaucophyllum*. *Vet Pathol*. 43:494–499.
10. Barros SS, Tabone E, Santos M, Andujar M, Grimaud JA. (1981). Histopathological and ultrastructural alterations in the aorta in experimental *Solanum malacoxylon* poisoning. *Virchows Arch*. 35:167–175.
11. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. (1999). Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:1852–1861.
12. Bobryshev YV, Orekhov AN, Sobenin I, Chistiakov DA. (2014). Role of bone-type tissue-nonspecific alkaline phosphatase and PHOSPO1 in vascular calcification. *Curr Pharm Des*. 20:5821-5828.
13. Boland R, Skliar M, Curino A, Milanesi L. (2003). Vitamin D compounds in plants. *Plant Sci*. 164:357–369.
14. Braun U, Diener M, Camenzind D, Flückiger TR. (2000). Enzootic calcosinosis in goats caused by golden oat grass (*Trisetum flavescens*). *Vet Rec*. 146:161–162.
15. Cabrera AL. (1979). Solanaceae. En: Burkart A. (Ed.), *Flora ilustrada de Entre Ríos*. Buenos Aires. INTA, Argentina, pp.346-452.
16. Campero CM, Odriozola E. (1990). A case of *Solanum malacoxylon* toxicity in pigs. *Vet Hum Toxicol*. 32:238–239.
17. Carrillo BJ, Worker NA. (1967). Enteque seco: arteriosclerosis y calcificación metastática de origen toxica en animales a pastoreo. *Rev Invest Agropec*. INTA. 2:9–30.

18. Cho HJ, Cho HJ, Kim HS. (2009). Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep.* 11:206-213.
19. Collett M, Brown S. (2018). Idiopathic enzootic calcinosis in a goat herd in New Zealand (10th international symposium on poisonous plants (ISOPP), Utah, USA). *Poisonous Plant Res.* 1(3): 35.
20. Collier WA. (1926). Contribución al conocimiento de la enfermedad de los bovinos conocida con el nombre de Entequé. Folleto del Ministerio de Agricultura de la Nación, Buenos Aires.
21. Collier WA. (1927). Zur kenntnis einer als entequé bezeichneten krankheit der rinder in der provinz Buenos Aires. *Z. für infektionskrankheiten.* 31(2):81–92.
22. Copland JL. (1975). Enzootic calcinosis of cattle in Papua, New Guinea. *Aust Vet J.* 51(6):326.
23. Dirksen G, Plank P, Hänichen T, Spiess A. (1972). Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knautgras (*Dactylis glomerata*), Göldhafer (*Trisetum flavescens*) und eine Gräsergemisch. *Dtsch Tierärztl Wschr.* 79:73–96.
24. Dirksen G, Plank P, Spiess A, Hänichen T, Dämmrich K. (1970). Über eine enzootische “Kalzinose” beim Rind. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen. *Dtsch. Tiärztl. Wochenschr.* 77:321–338.
25. Dirksen G, Plank T, Hanichen K, Dammrich A, Spiess A. (1971). Über eine enzootische “Kalzinose” beim Rind. Untersuchungen an Schafen mit selektiver Verfütterung von Klee, Gräser oder Kräuter. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 78:1–24.
26. Dixon JM. (1995). *Trisetum flavescens* (L.) Beauv. (T. Pratense Pers., Avena flavescens L.). *J Ecol.* 85(5):895–909.
27. Döbereiner J, Tokarnia CH, Costa JBD, Campos JLE, Dayrell M.S. (1971). “Espichamento”, intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal de Mato Grosso. *Pesq Agropec Bras.* 6:91–117.
28. Done SH, Döbereiner J, Tokarnia CH. (1976). Systemic connective tissue calcification in cattle poisoned by *Solanum malacoxylon*: A histological study. *Brit Vet J.* 132(1):28-38.
29. Donnelly E, Boskey AL. (2011). Mineralization. En: Feldman JD, Pike W, Adams J (2011) Vitamin D. Academic Press., London, United Kingdon, pp. 381–401.
30. Durand R, Figueredo JM, Mendoza E. (1999). Intoxication in cattle from *Cestrum diurnum*. *Vet Hum Toxicol.* 41:26–27.
31. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. (2018). Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res.* 114(4):590-600.
32. Franczyk A, Stolarz-Skrzypek K, Wesolowska A, Czarnecka D. (2014) Vitamin D and vitamin D receptor activators in treatment of hypertension and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 14:34-44.
33. Gadeau AP, Campan M, Millet D, Candresse T, Desgranges C. (1993). Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Arterioscler Thromb.* 13:120-125.

34. García y Santos C, Pereira R, Capelli A, Domingez R, Bonino F, Goyen JM, Arago S. (2007). Intoxicación espontánea em ovinos por ingestión de *Solanum glaucophyllum* (*malacoxylon*) en Uruguay. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, P-274-275.
35. García y Santos C, Pereira R, Etcheberry G, Goyen JM, Pérez W, Capelli A, Riet-Correa F. (2012). Enzootic calcinosis caused by *Nierembergia rivularis* in sheep. J Vet Diagn Invest. 24(2):423–426.
36. Giannitti F, Fraga M, Caffarena DR, Schild CO, Banchemo G, Armien AG, Travería G, Marthaler D, Wells SJ, Riet-Correa F. (2018). *Mycobacterium paratuberculosis* sheep type strain in Uruguay: Evidence for a wider geographic distribution in South America. J Infect Dev Ctries. 12:190-195.
37. Gill ES, Singh M, Chopra AK. (1976). Enzootic calcinosis in sheep: clinical signs and pathology. Am J Vet Res. 37(5):545–552.
38. Gimeno EJ. (2001). Calcinosis enzoótica em rumiantes: Un problema vigente de la ganadería nacional. Anales Acad Nac Agron Vet. 207-232.
39. Guedes KMR, Colodel EM, Castro MB, Souza MA, Arruda LP, Dianezi DM, Borges JRJ, Riet-Correa F. (2011). Calcinosose enzoótica em ruminantes no Brasil Central. Pesq Vet Bras. 31(8):643-648.
40. Heinritzi K, Kragenings G, Hanichen T. (1977). Untersuchungen über die kalzinogene Aktivität von siliertem Goldhafer (*Trisetum flavescens*). Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde. 39:139–147.
41. Hendershot JM. (1942). Naalehu Disease. Report of Board of Commissioners of Agriculture and Forestry, Hawaii. 23–24.
42. Hilbe M, Sydler T, Fischer L, Naegeli H. (2000). Metastatic calcification in a dog attributable to ingestion of a tacalcitol ointment. Vet Pathol. 37(5):490–492.
43. Holcombe H, Parry NM, Rick M, Brown DE, Albers TM, Refsal KR, Morris J, Kelly R, Marko ST. (2014). Hypervitaminosis D and metastatic calcification in a colony of inbred strain 13 Guinea Pigs, *Cavia porcellus*. Vet Pathol. 52(4):741–751.
44. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. (1981). Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. Science 211:590–593.
45. Howell DS, Pita JC. (1976). Calcification of growth plate cartilage with special reference to studies on micropuncture fluids. Clin Orthop Relat Res. 118:208–229.
46. Hughes L, Black L, Sherriff J, Dunlop E, Strobel N, Lucas R, Bornman J. (2018). Vitamin D content of Australian native food plants and Australian-grown edible seaweed. Nutrients. 10(7):1-9.
47. Iglesias VJ, Costa EF, Gimeno EJ. (2008). Calcinosis enzoótica en caprinos en la provincia de San Luis (XXXI Congreso Argentino de Producción Animal, Potrero de los Funes, San Luis). Revista Argentina de Producción Animal. 28(1):333-334.
48. Jäpelt RB, Jakobsen J. (2013). Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. Front Plant Sci. 136(4):1–20.
49. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. (2006). Vascular Calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. Circ Res. 99:1044–1059.

50. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. (2000). Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 275:20197–20203.
51. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, Furmanik M, Sanchis P, Torres R, Rosales M, Alvarez-Hernandez D, Rukshana S, Yin X, Muller K, Skepper JN, Mayr M, Reutelinsperger CP, Chester A, Bertazzo S, Schurgers LJ, Shanahan CM. (2015). Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 116:1312-1323.
52. Kapustin AN, Shanahan CM. (2016). Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation. *J Fisiol.* 594:2905-2914.
53. Kawashima H. (1987). Receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular smooth muscle cell line derived from rat aorta. *Biochem Bioph Res Co.* 146:1-6.
54. Koh E, Morimoto S, Fukuo K, Itoh K, Hironaka T, Shiraishi T, Onishi T, Kumahara Y. (1988). 1,25-dihydroxyvitamin D binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. *Life Sci.* 42:215-223.
55. Köhler H, Libiseller R. (1970). Über das Auftreten der sogenannten “Weidekrankheit” bei Kühen in Österreich in Zusammenhang mit Düngung und Fütterung. *Zbl. VetMed.* 17:289-337.
56. Köhler H. (1981). Zur Kalzinose in Österreich. Kalzinose beim Pferd. *Zentralbl. Vet. Med.* 28:187–200.
57. Krook L, Wasserman RH, McEntee K, Brokken TD, Teigland MB. (1975a). *Cestrum diurnum* poisoning in Florida cattle. *Cornell Vet.* 65:557–575.
58. Krook L, Wasserman RH, Shiverly JN, Tashjian AH, Brokken TD, Morton JF. (1975b). Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: implication of the shrub, *Cestrum diurnum*, as the causative agent. *Cornell Vet.* 65:26–56.
59. Lahite HB, Hurrell JA, Belgrano MJ, Jankowski LS, Mehlreter K. (1997). *Plantas de la Costa*. Lola, Buenos Aires, Argentina.
60. Liberman M, Marti LC. (2017). Vascular Calcification Regulation by Exosomes in the Vascular Wall. *Adv Exp Med Biol.* 998:151-160.
61. Libiseller R, Gunhold P. (1969). Calcinosen bei Kühen. *Naturwissenschaften.* 56:39.
62. Liedtke D, Hofmann C, Jakob F, Klopocki E, Graser S. (2020). Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase-A gatekeeper of physiological conditions in health and a modulator of biological environments in disease. *Biomolecules.* 10:1648.
63. Lignéres J. (1898). Contribution a l'étude de la pasteurellose bovine connue en Argentine sous le nom de “Diarrhé” et l'Entéqué. *Bullet de la Soc Centr Med Vet.* 16:761–792.
64. Lignéres J. (1912). Arteriosclerosis epidémica en el ovino. *Rev Zootec.* 4(37): 1–7.
65. Lim K, Thadhani R. (2020). Vitamin D toxicity. *Braz J Nephrol.* 1–7.
66. Lok ZSY, Lyle AN. (2019). Osteopontin in vascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 39:613-622.
67. Lynd FT, Willers EH, Weigh LA, Gebauer PW. (1965). Bovine arteriosclerosis in Hawaii. *Am J Res.* 26:1344–1349.

68. Machado M, Castro MB, Gimeno EJ, Barros SS, Riet-Correa F. (2020). Enzootic calcinosis in ruminants: a review. *Toxicon*. 187;1-9.
69. Machado M, Preliasco M, Schild CO, Costa RA, Balserini A, Giannitti F, Riet-Correa F. (2020). Thyroid parafollicular cell hyperplasia and carcinoma in a sheep with enzootic calcinosis due to *Nierembergia rivularis* poisoning. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 72(4):1561-1565.
70. Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbanska M, Lukaszkiwicz J, Płodowski P, Glenville J. (2018). Vitamin D toxicity-A clinical perspective. *Front. Endocrinol*. 9:1-7.
71. Marçolla EDC, Barros CSL, Barros SS, Russowsky D. (1997). Ultrastructural changes in the myocardium in the experimental poisoning of rabbits by calcinogenic plant *Solanum malacoxylum*. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 34(1):21-25.
72. Mederos A, Easton C, Paullier C, Gago M, Franchi M, Bove R. (1991). Comprobación de intoxicación por *Nierembergia repens* en ovinos del Uruguay. *Anales X Jornadas veterinarias de ovinos, Tacuarembó, Uruguay*.
73. Mello JRB. (2003). Calcinosis: Calcinogenic plants. *Toxicon*. 41:1-12.
74. Merrel AJ, Stanger B. (2016). Adult cell plasticity *in vivo*: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 17:413-425.
75. Micheloud JF, Rodriguez AM, Cámpora L, Webber N, Campero CM, Odriozola ER. (2012). Caso inusual de calcinosis enzoótica por el consumo de *Solanum glaucophyllum* en un encierro a corral. *Rev Med Vet*. 93(3/4):59-62.
76. Miller MA, Zachary JF. (2017). Mechanisms and morphology, of celular injury, adaptation, and death. En: Zachary J F (2017), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier, Saint Louis, Missouri, p. 33.
77. Mitsuhashi T, Morris RC, Ives H. (1991). 25-dihydroxyvitamin D modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 87:1889-1895.
78. Moraña JA, Barros SS, Driemeier D, Flôres YE. (1994). Gastropatia em coelhos experimentalmente induzida pela planta calcinogênica *Solanum malacoxylon*. *Pesq Vet Bras*. 14(1):35-42.
79. Morris KLM. (1982). Plant induced calcinosis: a review. *Vet Hum Toxicol*. 24: 34-48.
80. Morris KM, Simonite JP, Pullen L, Simpson JA. (1979). *Solanum torvum* as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea. *Res Vet Sci*. 27 (2):264-266.
81. Neumann F, Klopfer U. (1975). Calcinosis in sheep associated with C cell adenoma of the thyroid. *Vet. Med Small Anim Clin*. 70:1209-1212.
82. Neumann F, Nobel TA, Klopfer U. (1973). Enzootic calcinosis in goats. *J. Comp Pathol*. 83:343-350.
83. Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC, Collins ED, Taoka T, Sergeev I, Farach-Carson MC. (1992). 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, a steroid hormone that produces biologic effect via both genomic and nongenomic pathways. *J. Steroid Biochem Mol Biol*. 41(3):231-240.
84. Norman AW. (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 147(12):5542-5548.

85. Odriozola EO, Rodríguez AM, Micheloud JF, Cantón GF, Caffarena RD, Gimeno EJ, Bodega JJ, Gardey P, Iseas FB, Giannitti F. (2017). Enzootic calcosis in horses grazing *Solanum glaucophyllum*. *J Vet Diagn Invest.* 30(2):286-289.
86. Okada H, Fujimoto Y, Ohshima K, Matsukawa KC. (1991a). Cell hyperplasia and carcinoma developing in sheep with experimentally-induced lymphosarcoma. *J. Comp Pathol.* 105:313-322.
87. Okada H, Toyota N, Harimaya Y, Matsukawa K. (1991b). Immunohistochemical alterations of C cells in sheep treated with vitamin D. *J Comp Pathol.* 105:263-270.
88. Okada KA, Carrillo BJ, Tilley M. (1977). *Solanum malacoxylon* Sendtner: a toxic plant in Argentina. *Econ Bot.* 31(2):225–236.
89. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:8819–8823.
90. Onderscheka K, Laber S, Szekely H, Binder K. (1967). Chronischer magnesiummangel bei Kühen. *Wiener. Tierärztl. Monatsschr.* 54:219–236.
91. Orris IR. (2020). Extracellular pyrophosphate: The body's "water softener". *Bone.* 134:1-9.
92. Pardi MC, Santos JA. (1947). Ossificação pulmonar e calcificação vascular em bovinos do Pantanal do Mato Grosso. *Veterinaria.* 1:3–7.
93. Peixoto PV, Klem MAP, França TN, Nogueira VA. (2012). Hipervitaminose D em animais. *Pesq Vet Bras.* 32 (7):573–594.
94. Preliasco M, López F, Balserini A, Freire I, Collazo S, Uriarte G, Bove R, González AC. (2014). Descripción de tres focos de calcosis enzoótica en ovinos (Intoxicación por *Nierembergia repens* Ruiz & Pav.) diagnosticados en Uruguay. XLII Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, P-257-259.
95. Rambeck WA, Kreutzberg O, Bruns-Droste C, Zucker H. (1981). Vitamin D₃ in the grass *Trisetum flavescens*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 104(1):9–16.
96. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. (2004). Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 15:2857–2867.
97. Riet-Correa F, Méndez MC, Schild AL, Petiz CA. (1993). Enzootic calcosis in sheep: Experimental reproduction with *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq Vet Bras.* 13(1/2):21-24.
98. Riet-Correa F, Méndez MC, Schild AL, Santos EC, Scarsi R. (1981). Experimentos em coelhos sugerem *Nierembergia veitchii* como causa de calcosis enzoótica em ovinos do Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Bras.* 16:727-732.
99. Riet-Correa F, Riet-Correa I, Bellagamba C. (1975). Calcificación metastásica enzoótica en bovinos del Uruguay. *Vet Montevideo.* 12:15–23.
100. Riet-Correa F, Schild AL, Mendez MC, Wasserman R, Krook L. (1987). Enzootic calcosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq Vet Bras.* 7(3):85–95.

101. Riet-Correa, F, Schild, A L, Lemos, R A A, Borges, J R J. (2007). Intoxicação por plantas e micotoxinas. En: Riet-Correa, Mendez, M C (Eds.), Doenças de Ruminantes e Equídeos, 3ª ed, 2. Editora Pallotti, Santa Maria, pp. 182–184.
102. Rissi DR, Brown CC, Barros CSL. (2009). Chronic and acute clinical manifestations associated with systemic mineralization caused by ingestion of *Nierembergia veitchii* in sheep in southern Brazil. Small Ruminant Res. 87:102-104.
103. Rissi DR, Rech RR, Pierezan F, Kommers GD, Barros CSL. (2007). Poisoning in sheep by *Nierembergia veitchii*: observations in four outbreaks. Cienc Rural. 37(5):1393-1398.
104. Rivero R, Quintana S, Féola R, Haedo F. (1989). Principales enfermedades diagnosticadas en el área de influencia del laboratorio de diagnóstico regional noroeste del C. I. Vet. "Miguel Rubino". XVII Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, Uruguay, p-1-73.
105. Rosol TJ, Gröne A. (2015). Endocrine glands. En: Maxie MG. (2015) Jubb, Kennedy and Palmer's, pathology of domestic animals. Philadelphia: Elsevier, pp.332-336.
106. Rossanigo CE, Pablo RJ, Walter P, Manuel CPJ, Giselle RC, Carmen LE. (2017). Enzootic calcinosis in argentine goats due to presumptive intoxication with *Solanum stuckertii* Bitter. International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Sorrento, Italy, P-227.
107. Santos CEO, Pescador CA, Ubiali DG, Colodel EM, Souza MA, Silva JA, Canola JC, Marques LC. (2011). Intoxicação natural por *Solanum glucophyllum* (Solanaceae) em búfalos no Pantanal Matogrossense. Pesq Vet Bras. 31(12): 1053-1058.
108. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. (2011). Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. Circ. Res. 109, 697–711.
109. Shetty R, Pepin A, Charest A, Perron J, Doyle D, Voisine P, Dagenais F, Pibarot P, Mathieu P. (2006). Expression of bone-regulatory proteins in human valve allografts. Heart. 92:1303–1308.
110. Shetty R, Pepin A, Charest A, Perron J, Doyle D, Voisine P, Dagenais F, Pibarot P, Mathieu P. (2006). Expression of bone-regulatory proteins in human valve allografts. Heart. 92:1303–1308.
111. Shroff R, Long DA, Shanahan C. (2013). Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. J Am Soc Nephrol. 24:179-89;
112. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, Figg N, Schurgers LJ, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. (2010). Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. J Am Soc Nephrol. 21:103–112.
113. Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Hou W, Zhou Y. (2020) Osteopontin in bone metabolism and bone diseases. Med Sci Monit. 26:1-9.
114. Sinha S, Iyer D, Granata A. (2014). Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application. Cell Mol Life Sci. 71:2271-2288.
115. Sivioli F. (1896). Osificación de los pulmones de los bovinos. Anal del Círculo Médico Argentino. 19:360.

116. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. (2002). Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* 161:2035-2046.
117. Tibiriça PQT. (1927a). Arteriosclerose bovina. *Annaes Fac Med S Paulo.* 2:272–311.
118. Tibiriça PQT. (1927b). Ossificação na aorta bovina. *Annaes Fac Med S. Paulo* 2: 372–381.
119. Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Döbereiner J. (2012). Plantas que causam calcificação sistêmica (calcinose). In: Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Döbereiner J. (Eds.), *Plantas Tóxicas do Brasil para animais de produção.* Editora Helianthus., Rio de Janeiro, pp. 365–379.
120. Tustin RC, Pienaar CH, Schmitdt IM, Faul A, Van der Walt K, Boyazoglu PA, Boom HP. (1973). Enzootic calcinosis in sheep in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 44(4):383–395.
121. Vasconcelos RO, Barros SS, Russowski D, Grando SM, Irigoyen LF. (1998). Arterial diffuse intimal thickening associated with enzootic calcinosis of sheep. *Pesq Vet Bras.* 18(1):9–15.
122. Wada T, Mckee MD, Steitz S, Giachelli CM. (1999) Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 84:166–178.
123. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. (2001). Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev.* 21:274-301.
124. Wang J, Zhou JJ, Robertson GR, Lee VW. (2018). Vitamin D in vascular calcification: a double-edged sword? *Nutrients.* 22:1-17.
125. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 523:123-333.
126. Wanner MJ, Kessler J, Martig J, Tontis A. (1986). Enzootische Kalzinose bei Ziege und Rind in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 128:151–160.
127. Wasserman RH, Corradino RA, Krook LP. (1975). *Cestrum diurnum*: a domestic plant with 1,25-dihydroxycholecalciferol-like activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 62(1):85–91.
128. Wasserman RH, Henion JD, Haussler MR, McCain TA. (1976). Calcinogenic factor in *Solanum malacoxylon*: evidence that it is 1,25-dihydroxyvitaminD₃- glycoside. *Science.* 19:853-855.
129. Zazzeroni L, Faggioli G, Pasquinelli G. (2018). Mechanisms of arterial calcification: the role of matrix vesicles. *Eur J Vas Endovasc Surg.* 55:425-432.
130. Zhu D, Mackenzie NCW, Shanahan CM, Shroff RC, Farquharson C, MacRae VE. (2015). BMP-9 regulates the osteoblastic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells through an ALK1 mediated pathway. *J Cell Mol Med.* 19:165-174.

12. Anexo I

PUBLICACIONES:

- I. Machado M, Castro MB, Gimeno EJ, Barros SS, Riet-Correa F. 2020. **Enzootic calcinosis in ruminants: a review.** *Toxicon.* 187: 1-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.009>.
- II. Machado M, Castro MB, Wilson TM, Gonçalves AAB, Riet-Correa F, Barros SS. **Effects of the poisoning by *Nierembergia veitchii* on vascular smooth muscle cells: a contribution to the pathogenesis of enzootic calcinosis.** Se enviará a la revista *Veterinary Pathology*.
- III. Machado M, Schild CO, Preliasco M, Balserini A, Medeiros RMT, Barros SS, Riet-Correa F. (2020). **Enzootic calcinosis in sheep in Uruguay: a brief review and report of two outbreaks:** *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 40(11):831-836. El trabajo fue capa del fascículo 11 de 2020. Doi: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6766>.
- IV. Machado M, Preliasco M, Schild CO, Costa RA, Balserini A, Giannitti F, Riet-Correa F. 2020. **Thyroid parafollicular cell hyperplasia and carcinoma in a sheep with enzootic calcinosis due to *Nierembergia rivularis* poisoning.** 72(4):1561-1565. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* Doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11795>.