

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LOS DAÑOS CEREBELOSOS
OCASIONADOS POR LA INTOXICACIÓN EXPERIMENTAL CON *Solanum
bonariense* EN CAPRINOS**

por

**Nicolás ÁLVAREZ PEGAZZANO
Luis Alberto DURA CUELLO**

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el Título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Salud Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

FIRMAS DEL TRIBUNAL



Dra. Carmen García y Santos
Presidente del Tribunal de Defensa



Dra. Graciela Pedrana
Integrante del Tribunal



Dr. José Manuel Verdes
Tutor

AUTORES

Nicolás ÁLVAREZ PEGAZZANO
Luis Alberto DURA CUELLO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Manuel Verdes, “gallego” por la posibilidad brindada, el enfoque y la ayuda necesaria para lograr que este trabajo se encausara y llegara a buen puerto.

A los Dres., Alejandro Crampet, Juan Carlos Cruz y Antonio Moraña, por sus aportes técnicos, sabiduría y humor.

A Virginia Dehl, quien compartió muchas enseñanzas y su experiencia para facilitarnos el manejo con los animales.

Al personal de las Unidades Académicas de Biofísica y Patología, por permitirnos usar sus locaciones para llevar a cabo este estudio.

Al Pract. Vet. Oscar Correa por el uso de las instalaciones de su laboratorio y el tiempo dedicado al cuidado y mantenimiento de nuestros caprinos.

A la familia González – Castrillejo, en especial a Valentina, Mario y Mercedes, quienes nos brindaron su casa como si fuera la nuestra, su calidez, su sencillez y afecto.

A nuestros abuelos, presentes siempre por más que hoy algunos no estén entre nosotros.

A nuestras familias, en especial a nuestros padres, de los cuales admiramos y copiaremos la infinita paciencia y aliento que le brindan a un hijo. A ellos les debemos mucho más de lo que este trabajo representa.

Por último -y no menos importante-, a la familia que elegimos, nuestros amigos. Los que hoy están y los que no, que a pesar de la distancia siempre nos apoyaron, creyeron, y nos aceptan con los aciertos y errores.

A todas esas personas que forjaron nuestro pasar por esta casa de estudio, y que de la manera menos pensada nos ayudaron a llegar a un objetivo en común, el cual compartimos y logramos en conjunto.

A todos Muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Aspectos botánicos y toxicológicos del <i>Solanum bonariense</i>	9
2.2 Epidemiología, signos clínicos y hallazgos anatomo-patológicos en bovinos intoxicados con <i>Solanum bonariense</i>	11
2.3 Neuroanatomía funcional y neurofisiología del cerebelo de los bovinos.....	12
2.4 Histopatología y caracterización de las lesiones en casos de intoxicación con especies de <i>Solanum</i> que causan degeneración cortical cerebelosa en bovinos.....	16
2.5 Bases de la lectinohistoquímica para caracterizar los acúmulos intracelulares en casos de bovinos intoxicados con especies de <i>Solanum</i>	17
2.6 Fundamentación e hipótesis del presente trabajo de tesis.....	19
3. OBJETIVO GENERAL.....	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Recolección e identificación de <i>S. bonariense</i>	21
5.2 Protocolo de intoxicación experimental en caprinos.....	21
5.3 Necropsia y toma de muestras.....	22
5.4 Histopatología y lectinohistoquímica.....	22
5.5 Análisis estadísticos de los resultados	23
6. RESULTADOS.....	24
6.1 Planta administrada y confirmación de signos cerebelosos.....	24
6.2 Hallazgos anatomopatológicos.....	26
6.2.1- Histopatología.....	26
6.2.2- Lectinohistoquímica.....	29
6.- Recuento de células de Purkinje y análisis estadístico de los resultados.....	31
7. DISCUSIÓN.....	33
8. CONCLUSIONES.....	36
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

		Página
Figura 1	<i>Solanum bonariense</i> L. (1753) en flor y con presencia de frutos maduros e inmaduros, de ahí su nombre vulgar naranjillo (Verdes et al., 2006).....	9
Figura 2	Esquema del funcionamiento neuronal cerebeloso, donde vemos que la célula de Purkinje responde a cualquier estímulo de manera inhibitoria (tomado de Kandel et al., 1997).....	15
Figura 3	Cabra 4 luego de recibir 0.524 Kg/PV Planta seca y molida durante 362 días, mostrando en la secuencia de fotos durante la realización de la prueba HRT caída sin pérdida de conciencia y recuperación luego de unos segundos (positividad a alteración cerebelosa de acuerdo con Piennar et al. (1976)	25
Figura 4	Corteza cerebelosa de Cabra 4. Las flechas señalan diferentes grados de degeneración de neuronas de Purkinje (tinción HE, 400 x).....	27
Figura 5	Corteza cerebelosa de Cabra 1. Detalle de acúmulo vesicular en células de Purkinje en diferente grado de degeneración (tinción HE, 1000 x).....	27
Figura 6	Corteza cerebelosa de Cabra 1. Se observan células de Purkinje en diferentes grados de degeneración (tinción AT, 400 x).....	28
Figura 7	Corteza cerebelosa de Cabra 1. Detalle de acúmulo vesicular en células de Purkinje en diferente grado de degeneración (tinción AT, 1000 x).....	28
Figura 8	Corteza cerebelosa de Cabra 4. Obsérvese la marcación fuerte a Con-A (arriba) y sWGA (abajo) en el pericarion de las células de Purkinje del animal intoxicado (LHQ, contraste hematoxilina de Harris, 400 x).....	30
Figura 9	Histograma de barras donde se visualiza las diferencias significativas en el media (\pm e.e.m.) de disminución del número de células de Purkinje entre los grupos C y D en comparación con A y B.....	33
Tabla 1	Lectinas usadas, abreviatura y afinidad a residuos sacaridos.....	23
Tabla 2	Resumen de la cantidad de planta suministrada y porcentaje de dosis con respecto a la dosis de inducción de signos cerebelosos por HRT.....	25
Tabla 3	Intensidad de reacción en la unión de diferentes lectinas en células de Purkinje en cortes de cerebelos de animales intoxicados y normales.....	29
Tabla 4	Comparación no paramétrica mediante Kruskal-Wallis, lo que nos permite comparar entre grupos y ver las diferencias significativas para los diferentes grados de intoxicación en relación a la dosis de inducción de signos cerebelosos.....	32

RESUMEN

Solanum bonariense es un arbusto ampliamente distribuido en Uruguay, Argentina y el sur de Brasil, cuya ingestión provoca la degeneración cortical cerebelosa en bovinos. La demostración de la toxicidad en caprinos podría aportar información nueva sobre el uso de la cabra como modelo animal de esta intoxicación, permitiendo avanzar en el conocimiento de la patogénesis de esta neurodegeneración. En el presente estudio, se utilizaron 5 cabras que recibieron un bolo oral de hojas secas de *S. bonariense* mezcladas con melaza, equivalente al 0,75% del peso corporal/día hasta la confirmación de signos cerebelosos, mientras que, a otros dos, a los que se le suministró un bolo diario con fardo de alfalfa picado fino y melaza, en igual proporción a la usada en los caprinos tratados con *S. bonariense*, se utilizaron como controles. La dosis diaria acumulada que provocó signos cerebelosos a los 362 días, fue de 0,524kg de hojas secas de *S. bonariense* /kg PV (equivalente a 2,251 kg hojas frescas de *S. bonariense* / kg de PV). Los signos clínicos fueron: ataxia, aumento de la base de sustentación, temblores de intención, mioclonias, dificultad para mantenerse apoyado en los miembros posteriores, o alcanzar objetos o comida por encima del nivel de la cabeza, y reacción positiva a la prueba de elevación de la cabeza con liberación súbita (*Head Raising Test*). El estudio histopatológico de los caprinos tratados, reveló lesiones cerebelosas con características similares a las reportadas en bovinos, caracterizándose por la pérdida progresiva de células de Purkinje en la corteza cerebelosa de los animales intoxicados experimentalmente. Se confirmó la toxicidad experimental del *S. bonariense* para caprinos, identificando y caracterizando los signos cerebelosos, así como la pérdida progresiva de células de Purkinje de la corteza cerebelosa.

ABSTRACT

Solanum bonariense is a shrub widely distributed in Uruguay, Argentina, and southern Brazil, the ingestion of which causes cerebellar cortical degeneration in cattle. The demonstration of toxicity in goats could provide information on the use of the goat as an animal model of this intoxication, allowing to advance in the knowledge of the pathogenesis of this neurodegeneration. In the present study, 5 goats received an oral bolus of dried leaves of *S. bonariense* mixed with molasses, equivalent to 0.75% of body weight / day until the confirmation of cerebellar signs, while another two goats, used as control animals, which were given a daily bolus with finely chopped dried leaves of alfalfa and molasses, in the same proportion as that used in goats treated with *S. bonariense*. The accumulated daily dose that caused cerebellar signs at 362 days was 0.524kg of dry leaves of *S. bonariense* / kg BW (equivalent to 2.251 kg fresh leaves / kg LW). The clinical signs were: ataxia, increased base stance, intention tremors, myoclonus, difficulty in keeping supported on the hind limbs, or reaching objects or food above the head level, and positive reaction to Head Raising Test (HRT). The histopathological study of treated goats revealed cerebellar lesions with similar characteristics to those reported in bovines, characterized by the progressive loss of Purkinje cells in the cerebellar cortex of experimentally intoxicated animals. The experimental toxicity of goats with *S. bonariense* was confirmed, by identifying and characterizing the cerebellar signs, as well as the progressive loss of Purkinje cells of the cerebellar cortex.

INTRODUCCIÓN

El *Solanum bonariense* L. (*S. bonariense*), conocido popularmente como “naranjillo”, es un arbusto autóctono y perenne distribuido en todo el territorio nacional, especialmente abundante en el litoral del río Uruguay y sus afluentes (Linnaeus, 1753; Lombardo, 1983). Los bovinos que lo ingieren durante largos períodos de forma natural o experimental, desarrollan una degeneración cortical cerebelosa caracterizada histopatológicamente por vacuolización y desaparición de las células de Purkinje, con presencia de torpedos axonales y microcavitaciones en la sustancia blanca del cerebelo (Verdes et al., 2006). Las lesiones encontradas en este tipo de degeneración cerebelosa, así como las observadas en otros casos descritos en intoxicaciones por plantas del género *Solanum* en rumiantes, son similares a las constatadas en enfermedades de acúmulo lisosomal y en gangliosidosis adquiridas o heredables descritas en humanos y en diferentes especies animales (Pienaar et al., 1976; Menzies et al., 1979; Riet-Correa et al., 1983; Bourke, 1997; Porter et al., 2003). Para producir este tipo de enfermedades, se requiere de la inhibición o de la alteración de hidrolasas lisosomales específicas, desencadenando el acúmulo de los residuos glucídicos específicos no digeridos dentro de las células afectadas (Jolly y Walkley., 1997).

En el caso de *S. bonariense*, también se ha confirmado que la intoxicación en bovinos provoca en las células de Purkinje un acúmulo vesicular con presencia de cuerpos residuales electrón-densos en su interior y una desagregación de los ribosomas asociados a las membranas del retículo endoplásmico (Verdes et al., 2006). Estas vesículas podrían ser lisosomas, pero resulta poco probable que las vesículas con similar contenido que se encuentran acumuladas dentro de los axones, ubicadas a gran distancia del soma también lo sean (Verdes et al., 2006). Este acúmulo vesicular intra-axonal podría estar determinado por la inhibición de la síntesis de elementos de citoesqueleto en el soma de estas neuronas, determinándose así, la alteración del transporte axoplásmico con la consiguiente acumulación de vesículas de exocitosis y endocitosis y mitocondrias en estructuras denominadas esferoides axonales (Verdes et al., 2006). Esta hipótesis se ha confirmado en otras enfermedades neurodegenerativas en humanos, cuya causa primaria es la alteración del transporte axoplásmico (Summers, Cummings y De Lahunta, 1995).

En la intoxicación con *S. bonariense* en bovinos existen alteraciones tanto de la inmunorreactividad contra elementos de citoesqueleto (Verdes et al., 2015), como de la ubiquitina en su forma conjugada, lo que confirmaría una participación de la ruta hidrolítica no lisosomal mediada por el sistema Ubiquitina/Proteasoma -UPS- (Verdes et al., 2006). Encontrándose una inmunomarcación contra Calbindina D 28K similar a lo normal en las células de Purkinje sobrevivientes a la intoxicación -esta proteína es la principal moduladora de la concentración de calcio intracelular en este tipo neuronal-, sin identificar células apoptóticas en los mismos cortes, lo que nos lleva a afirmar que la muerte de estas células no se produce por apoptosis (Verdes et al., 2010).

Esto último, junto con la alta especificidad del daño a la célula de Purkinje observado en esta intoxicación, se contrapone a la idea de que este tipo de degeneración cerebelosa sea debido exclusivamente a la inhibición de la actividad hidrolítica lisosomal, tal como ocurre en otros casos de intoxicaciones por plantas en los que se afectan muchos otros tipos celulares en el organismo, incluidas también las células de Purkinje del cerebelo (Jolly et al., 1997). De lo discutido hasta aquí, podemos decir que se ha avanzado de forma importante en el conocimiento de esta enfermedad, en lo que respecta a la descripción de las lesiones causantes de la misma en los bovinos, siendo una línea de investigación que sigue aportando nuevo conocimiento. Debido a las dificultades que surgen para seguir estudiando experimentalmente esta intoxicación en bovinos -mayores costos operativos, así como mayores dificultades de manejo-, hemos comenzado a explorar el estudio experimental de esta intoxicación en caprinos (Verdes et al., 2013), ya que existen reportes de intoxicación natural en esta especie con otros miembros de esta familia de solanáceas que causan degeneración cerebelosa (Bourke, 1997; Porter et al., 2003). El objetivo de este trabajo fue desarrollar mediante la intoxicación experimental de caprinos, un modelo animal alternativo al uso de bovinos, caracterizando histopatológicamente las lesiones identificadas en la corteza cerebelosa de los caprinos intoxicados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aspectos botánicos y toxicológicos del *Solanum bonariense*.

El *S. bonariense* es un arbusto perenne que se encuentra ampliamente distribuido en Argentina, sur de Brasil y Uruguay (Linnaeus, 1753). En Montevideo se lo encuentra en lugares bajos y húmedos, en muchos casos donde hubo actividad humana como especie ruderal (Figura 1). Los bovinos que ingieren esta planta por tiempos prolongados, desarrollan una degeneración cortical cerebelosa caracterizada por un cuadro de ataxia, hipermetría, hiperestesia, marcha tambaleante, temblores musculares, extensión de cabeza y miembros torácicos, opistótonos y nistagmo (Riet-Correa et al., 1983; Verdes et al., 2006). En otros países, se han descrito otras especies de este género que producen síntomas y lesiones similares en bovinos (Pienaar et al., 1976; Menzies et al., 1979; Riet-Correa et al., 1983; Guaraná et al., 2011, Lima et al., 2014) y cuadros cerebelosos similares en caprinos en pastoreo en Australia y EE. UU. (Bourke, 1997, Porter et al., 2003). Hasta el momento, no se ha confirmado experimentalmente la intoxicación en cabras de ninguna de estas especies de *Solanum* (Bourke, 1997; Porter et al., 2003).



Figura 1. *Solanum bonariense* L. (1753) en flor y con presencia de frutos maduros e inmaduros, de ahí su nombre vulgar naranjillo (Verdes et al., 2006).

La importancia de las intoxicaciones por plantas en rumiantes radica en que algunas de las mismas, se encuentran en zonas de explotaciones ganaderas. En nuestro país la ganadería se basa en sistemas pastoriles, siendo el principal recurso forrajero el campo natural. En esto radica el reconocimiento de aquellas especies vegetales potencialmente tóxicas para los rumiantes en pastoreo. En el caso de aquellas especies como el *S. bonariense*, que ocasionan neurodegeneración, afectando la salud y el bienestar animal, provocando pérdidas económicas directas e indirectas para los productores y el país (Medeiros et al., 2001). Estudios de incidencia en la región y el país, demuestran que las pérdidas económicas ocasionadas por el consumo de plantas tóxicas pueden ser de gran importancia. Un relevamiento expone que en Rio Grande do Sul (Brasil) con una población bovina de 13 millones de cabezas, las pérdidas económicas se estiman entre 12,8 a 18 millones de dólares, en Uruguay (población bovina de 14 millones de cabezas) las pérdidas económicas estimadas serían de 19,6 millones de dólares (Medeiros et al., 2001).

Una característica general de todos los vegetales es su gran habilidad para biosintetizar un amplio rango de compuestos no nutricionales, generalmente de bajo peso molecular, llamados metabolitos secundarios. Dentro de este grupo encontramos entre otros a las saponinas y a los glicoalcaloides, que aparecen expresados especialmente en la familia Solanaceae. Las saponinas tienen una notoria actividad biológica, incluyendo hemólisis, toxicidad para animales de sangre fría y una potente actividad antimutagénica y citostática. Por su parte los glicoalcaloides ejercen efectos deletéreos sobre una variedad de sistemas biológicos, incluyendo membranas, organelos y células aisladas, llegando incluso a afectar al ser humano (Vázquez, 1997). Como se mencionó previamente, a través de estos metabolitos secundarios, muchos miembros del género *Solanum* causan una variedad de cuadros clínicos, a modo de ejemplo hipervitaminosis D, cuadros tremorgénicos, y nerviosos tanto en animales como en el hombre (Baker et al., 1989).

Aunque no se han aislado los principios activos en aquellas especies de *Solanum* que causan degeneración cortical cerebelosa, se puede suponer que las sustancias causantes de estas enfermedades en diferentes partes del mundo deberían ser similares. Pese a ello, aún no se han podido identificar

fracciones solubles de estas plantas que reproduzcan experimentalmente la degeneración cerebelosa observada por la ingestión de este grupo de plantas en los bovinos o en los caprinos. Por lo que el desarrollo de modelos experimentales de esta intoxicación podría ser de utilidad para ayudar a entender la patogenia y estudiar las toxinas presentes en las plantas que ocasionan la degeneración cerebelosa en bovinos (Verdes et al., 2006).

En otros casos de intoxicación por plantas con especies vegetales pertenecientes a los géneros *Swainsona*, *Ipomoea*, *Astragalus* y *Oxytropis*, se han identificado varios alcaloides dentro de los que se encuentra la swansonina, con propiedades inhibitoras de las glicosidasas, siendo estructuralmente similares a otra familia de alcaloides, las hidroxindolizidinas, de las que se conoce su neurotoxicidad en diferentes especies animales, así como su capacidad de inducir una sintomatología con características muy similares a la observada en la degeneración cortical cerebelosa reportada en las intoxicaciones por especies de *Solanum*, aunque con lesiones nerviosas menos específicas y con afectación de otros órganos y sistemas que llevan a la muerte de los animales intoxicados. En estos casos la muerte de los animales se produce por el desarrollo de una enfermedad de acúmulo lisosomal adquirida por la inhibición específica de enzimas hidrolíticas lisosomales, que afecta además de a las células de Purkinje de la corteza cerebelosa, a otros grupos neuronales del SNC y del SNP, además de hígado, páncreas, riñones, tiroides, linfonodos y macrófagos, ocasionando una α -manosidosis generalizada (Stegelmeier et al., 1999); llegando en algunos de estos casos a identificarse patrones de marcación de lectinohistoquímica coincidente con α -manosidosis hereditarias (Driemeier et al., 2000).

Epidemiología, signos clínicos y hallazgos anatomo-patológicos en bovinos intoxicados con *Solanum bonariense*.

En el Uruguay, la intoxicación natural reportada por Verdes et al., (2006), nos dice que esta intoxicación afecta principalmente a animales mayores de un año, encontrando en el brote descrito una morbilidad del 17,5% y una mortalidad inferior al 1%. Este mismo grupo de investigadores, en un estudio experimental, detalla la cantidad de planta requerida y el periodo de tiempo por el cual debe ser ingerida la planta por el animal, para reproducir la aparición del

síndrome cerebeloso y las lesiones celulares identificadas y caracterizadas en la corteza cerebelosa de los casos de intoxicación natural (Verdes et al., 2006). En este trabajo, también buscaron posibles cambios serológicos en los animales afectados, concluyendo que no hay alteraciones en las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina (FA), aspartato amino transferasa (AST) y gamma glutamil transferasa (GGT), tanto en los casos naturales como experimentales (Verdes et al., 2006). Durante la necropsia, no se identificaron lesiones macroscópicas, siendo este un factor común con las intoxicaciones reportadas para esta planta en bovinos, así como para las otras especies de *Solanum* que causan degeneración cortical cerebelosa en rumiantes (Pienaar et al., 1976; Menzies et al., 1979; Riet-Correa et al., 1983; Bourke et al., 1997; Porter et al., 2003; Verdes et al., 2006, Lima et al., 2014). En cuanto al estudio histopatológico del cerebelo de los animales intoxicados natural o experimentalmente, este trabajo caracteriza la alta especificidad de las lesiones celulares en la corteza cerebelosa producidas por la ingestión de *S. bonariense* (Verdes et al., 2006). En trabajos posteriores del mismo grupo se identificaron y caracterizaron patrones de marcación contra lectinas a través de la técnica de lectinohistoquímica (Sant'Ana et al., 2010), reconociéndose algunas características en común, así como algunas diferencias con los reportes previos para *S. fastigiatum* var. *fastigiatum*, actualmente sinonimizado como *S. bonariense* (Paulovich et al., 2002; Verdes, 2006; Verdes et al., 2011).

Neuroanatomía funcional y neurofisiología del cerebelo de los bovinos.

El cerebelo coordina la actividad muscular y mantiene la postura y el equilibrio. Está constituido por una corteza de sustancia gris (lugar del tejido nervioso donde se localizan los cuerpos neuronales) y una zona central de soporte constituida por sustancia blanca (constituido principalmente por los axones neuronales y células gliales) (Verdes, 2006).

La corteza de todo el cerebelo está formada por tres capas y contiene principalmente cinco tipos de neuronas: estrelladas, en cesta, de Golgi, granulosas y de Purkinje (Verdes, 2006).

La capa más externa es la capa molecular, constituida principalmente por los axones de las células granulosas, denominándoseles fibras paralelas, las dendritas de las neuronas ubicadas en capas más profundas (como los

árboles dendríticos de las células de Purkinje) e interneuronas inhibitoras dispersas, las células en cesta y las estrelladas (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003; Verdes, 2006).

La capa media de células de Purkinje la forman los cuerpos de estas grandes neuronas, con sus axones dirigidos hacia los núcleos cerebelosos profundos. Son las únicas neuronas que salen de la corteza cerebelosa y son de tipo GABAérgico (neuronas inhibitoras), ya que utilizan ácido gamma amino-butírico (GABA) como neurotransmisor (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003; Verdes, 2006).

Por último, la capa más interna de la corteza cerebelosa es la capa de células granulosas, que contiene un gran número de células granulosas y algunas células de Golgi (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003; Verdes, 2006).

En cuanto a los movimientos, podemos decir que se puede dividir en dos formas generales. La primera es la forma aprendida, voluntaria consciente y dirigida, generalmente mediada por músculos flexores. La segunda se caracteriza por un tono muscular postural, anti-gravitatorio, que suele ser subconsciente e involuntario y que es el resultado de la contracción de músculos extensores (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

El movimiento mediado por los flexores se produce por la contracción muy discreta de pocos grupos musculares, la mayoría distales a la columna vertebral. El hecho de estar de pie siempre es un acto motor que se opone a la gravedad. Por tanto, el tono muscular postural aparece por la contracción continua de grandes grupos musculares anti-gravitatorios extensores, muchos de los cuales se localizan cerca de la columna vertebral (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

Al contrario de lo que ocurre con el sistema sensitivo, que transforma la energía física en información neuronal, el sistema motor transforma la información neuronal en energía física. De esta forma, y considerando lo mencionado previamente, podemos afirmar que todo movimiento es el resultado de la contracción de una cantidad variable de fibras musculares extra-fusales dentro de un determinado número de unidades motoras (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). Estas fibras no se contraen hasta que no reciben la orden de la neurona motora inferior, y que, a su vez, no envía un potencial de acción si no lo mandan las neuronas motoras superiores

descendientes desde el cerebro o desde los nervios sensitivos que forman el arco reflejo (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). Por tanto, la neurona motora es la vía neuronal final por la que el cerebro puede empezar las contracciones del músculo extra-fusal que produce los movimientos voluntarios y anti-gravitatorios (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

El inicio del movimiento aprendido, dirigido y voluntario es responsabilidad de un grupo de neuronas motoras superiores ubicadas en el sistema piramidal (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). El grupo de neuronas motoras superiores que forma el sistema extra-piramidal se encarga de iniciar el tono muscular extensor postural y anti-gravitatorio (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). Un tercer grupo de neuronas motoras, las del cerebelo, ayuda a coordinar el movimiento iniciado por los sistemas piramidal y extra-piramidal, comparando de manera constante el movimiento intencionado con el real y haciendo los ajustes necesarios (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

Todo este sistema recibe información exterior a través de dos sistemas diferentes y complementarios. Por un lado, encontramos el sistema de receptores de estiramiento de los músculos esqueléticos (integrados por husos musculares y órganos tendinosos de Golgi), y por otro, el sistema vestibular (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). Este último, está compuesto por un sistema bilateral de receptores localizado en el oído interno, que informa al cerebro sobre la posición y el movimiento de la cabeza en el espacio. El sistema vestibular es una localización frecuente de lesiones que, en casi todas las especies de interés veterinario, provocan un síndrome caracterizado por inclinación de la cabeza, marcha en círculos, pérdida de equilibrio y nistagmo (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

Habiendo ya mencionado dos de los tres sistemas, hablaremos finalmente del tercer sistema en actuar. El cerebelo ejerce su función principal de coordinador de las órdenes motoras, este órgano necesita recibir primero la información de los sistemas piramidal y extra-piramidal sobre el movimiento que ha ordenado (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003), también recibe información de los husos musculares, los sistemas visual y vestibular y otros receptores sensitivos para conocer el movimiento que en realidad se está realizando (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

El cerebelo no es necesario para la sensibilidad o el movimiento, ya que

la fuerza muscular permanece casi intacta, aunque éste sea completamente destruido (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). Sin embargo, sí es una región del SNC imprescindible para coordinar el movimiento iniciado por otras partes del cerebro, ya que su principal función es ajustar los impulsos de salida de los sistemas piramidal y extra-piramidal. Las lesiones del cerebelo producen defectos clínicos significativos en la forma de realizar los movimientos (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003; Verdes, 2006) (Figura 2).

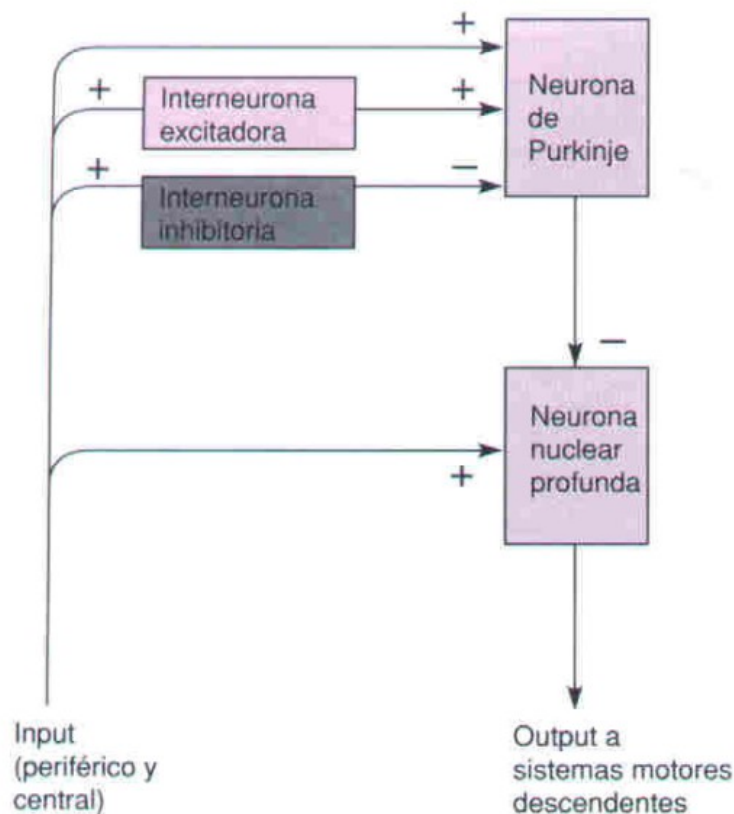


Figura 2. Esquema del funcionamiento neuronal cerebeloso, donde vemos que la célula de Purkinje responde a cualquier estímulo de manera inhibitoria (tomado de Kandel et al., 1997).

Entonces, de lo expresado hasta aquí, claramente se concluye que una alteración severa de las células de Purkinje, dará como resultado la falta del control inhibitorio del impulso nervioso, traduciéndose esta como ausencia o disminución de la regulación fina de los movimientos del paciente con daño cerebeloso (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003). Por tanto, cabe esperar en la sintomatología clínica de animales con una alteración severa del funcionamiento de las células de Purkinje, la aparición de típicos signos

cerebelosos tales como: disimetría, hipermetría, paso tambaleante, temblores de intención, todos ellos indicadores claros de la falta de control inhibitorio ejercida por la corteza cerebelosa sobre cualquier rutina motora (Kandel et al., 1997; Cunningham, 2003).

Histopatología y caracterización de las lesiones en casos de intoxicación con especies de *Solanum* que causan degeneración cortical cerebelosa en bovinos.

Las lesiones encontradas en la corteza cerebelosa de los bovinos intoxicados naturalmente con *S. bonariense*, se caracterizan por la alteración específica de las células de Purkinje, llegando a encontrarse casos severos, en los que se observa desaparición completa de esta capa en toda la folia cerebelosa. En aquellos casos en los que aún se observan algunas células de Purkinje, éstas aparecen tumefactas, pálidas y con presencia de abundantes vesículas en su citoplasma. El núcleo se observa picnótico o distendido y en muchos casos desplazado hacia la periferia de las células. A continuación de estos cambios degenerativos, las neuronas de Purkinje aparentemente desaparecen, dejando espacios vacíos en esa capa celular. Simultáneamente se observa la presencia de esferoides axonales con contenido eosinofílico y microcavitaciones en la sustancia blanca cerebelosa, con desarrollo de gliosis y una degeneración tipo Walleriana de los axones afectados (Verdes et al., 2006). La reproducción experimental de la intoxicación confirma las lesiones descritas en los casos naturales, existiendo una alteración dependiente de la dosis de planta suministrada, coincidiendo con lo descrito previamente en otros reportes de intoxicaciones experimentales con esta y otras especies de *Solanum* en bovinos (Pienaar et al., 1976; Riet-Correa et al., 1983; Verdes et al., 2006; Guaraná et al., 2011).

Bases de la Lectinohistoquímica para caracterizar los acúmulos intracelulares en casos de bovinos intoxicados con especies de *Solanum*.

En estudios anteriores para la caracterización de enfermedades de acúmulo lisosomal (tanto de origen hereditario como adquirido), y en diferentes especies animales (incluyendo a los bovinos), se ha usado como técnica confirmatoria la lectinohistoquímica para identificar aquellos residuos

glucídicos, que específicamente se acumulan dentro de los lisosomas en diferentes tipos celulares y especialmente en el pericarion de las neuronas afectadas por este grupo de enfermedades. Para el caso de los acúmulos citoplasmáticos identificados en las células de Purkinje, en aquellos casos de intoxicación por diferentes especies de *Solanum*, también se ha intentado su uso como técnica complementaria al diagnóstico histopatológico convencional usando Hematoxilina-Eosina.

Esta técnica se basa en la utilización de un grupo heterogéneo de proteínas no inmunes, denominadas genéricamente lectinas, que tienen la propiedad de reconocer y unirse con alta especificidad a los carbohidratos o residuos glucídicos que son expresión de los glucoconjugados. Estas sustancias se obtienen de vegetales (semillas y plantas), tejidos animales, bacterias y hongos. Su valor histoquímico se basa en su capacidad para localizar, identificar y distinguir carbohidratos en los tejidos con alta sensibilidad y especificidad, en condiciones normales, siendo especialmente útiles en tejidos patológicos en los que se produzcan acúmulos de carbohidratos (Damjanov, 1987).

La técnica de tinción puede identificar la presencia de carbohidratos. El uso de lectinas nos permite así, caracterizar la presencia de azúcares en los preparados histológicos con alta especificidad (Alroy et al., 1986,1988; Murmane y col., 1989; de Maria et al., 1998; Paulovich et al., 2002).

Diferentes investigadores usando esta técnica han caracterizado las lesiones de bovinos intoxicados con distintas especies de *Solanum*, entre ellos, Verdes (2006) y Sant'Ana et al. (2010), comparan marcaciones de lectinas en casos experimentales y naturales para *S. bonariense* (sinónimo *S. fastigatum* var. *fastigatum*), encontrando en estos casos, marcación positiva para sWGA, Con-A, en el interior de los acúmulos intracelulares de las células de Purkinje, independientemente del grado de lesión que tengan estas neuronas (de leve a severamente afectadas) y una fuerte marcación para LCA en casos naturales provenientes de Brasil. Para el caso de la intoxicación descrita en bovinos de Sudáfrica con *Solanum kwebense*, la lectinohistoquímica muestra una tinción fuerte a Con-A y una tinción más leve a sWGA y WGA, estos autores concluyen que las neuronas de Purkinje son incapaces de metabolizar una toxina vegetal o sustrato celular que no lograr caracterizar (Van der Lugt et al., 2010).

FUNDAMENTACIÓN E HIPÓTESIS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Por todo lo expuesto hasta aquí, es que estudiamos la intoxicación experimental de *S. bonariense*, usando como modelo animal al caprino, ya que existen en el mundo dos reportes de intoxicaciones naturales con plantas del género *Solanum* en esta especie, sin que en ninguno de los casos reportados se haya realizado la intoxicación experimental (Bourke et al., 1997; Porter et al., 2003, Verdes et al., 2013).

La hipótesis de trabajo es que el caprino es sensible a la intoxicación con *S. bonariense*, y que la reproducción experimental en condiciones controladas desarrollará lesiones celulares similares a las descritas en el bovino, las que serán confirmadas mediante el estudio histopatológico convencional (tinción de Hematoxilina-Eosina), complementándola con la tinción de Azul de Toluidina y la técnica de lectinohistoquímica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterización histopatológica y lectinohistoquímica de los daños cerebelosos ocasionados por la intoxicación experimental en caprinos y su comparación con lo observado en bovinos intoxicados natural y experimentalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar, caracterizar y cuantificar por histopatología las posibles lesiones cerebelosas en los caprinos intoxicados experimentalmente con *S. bonariense*.
2. Comparar los daños cerebelosos de los caprinos con los observados en los bovinos utilizando como herramientas la histopatología y la lectinohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección e identificación de *S. bonariense* (Linnaeus, 1753).

Para realizar el presente proyecto se colectó *S. bonariense* en predios del entorno de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República – Udelar (Sayago, Montevideo), como se describió previamente (Verdes et al., 2006), la identificación de los especímenes y su archivo estuvo a cargo del Téc. Botánico Julián Gago (Museo y Jardín Botánico “Prof. Atilio Lombardo”, IMM, Montevideo, Uruguay). La planta colectada se pesó verde, se secó a la oscuridad, se pesó seca, se calculó la merma del peso luego del secado, y fue almacenada para su utilización en los protocolos de intoxicación experimental de caprinos.

Protocolo de intoxicación experimental en caprinos

Animales utilizados en la reproducción experimental.

La reproducción experimental de la intoxicación se desarrolló en el predio de la Facultad de Veterinaria de la Udelar como parte del proyecto financiado CSIC (I+D) 2008 “Desarrollo de un modelo experimental de degeneración cortical cerebelosa en caprinos asociado a la ingestión de *Solanum bonariense*: una herramienta para mejorar el conocimiento de las bases biológicas y químicas de esta intoxicación en rumiantes”, con la aprobación de la CEUA-FVET (Udelar). Se utilizaron 7 caprinos (cruzas Saanen / Pardo Alpina), machos castrados provenientes del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria –INIA- “Las Brujas” (ruta 48, km 10, Rincón del Colorado, Canelones). Los animales se mantuvieron con fardo de alfalfa de buena calidad, ración para lanares de cabaña (Barraca González Lamela, Montevideo) y agua *ad libitum*. Se elaboró una ficha clínica de cada animal procediendo a la incorporación de los datos clínicos que fuesen surgiendo a lo largo del protocolo experimental. El grupo tratado (n = 5) recibió diariamente bolos vía oral con una cantidad de hojas secas y molidas de *S. bonariense* equivalente al 0.75% del Peso Vivo mezclada con ración y melaza. Para el caso del grupo testigo (n = 2), este recibió diariamente en bolos una cantidad similar de fardo de alfalfa de buena calidad seco y molido equivalente al 0.75% PV, mezclado con ración y melaza. Los animales fueron observados diariamente y pesados semanalmente para ajustar

las cantidades de planta a suministrarles. La aparición de sintomatología cerebelosa se controló durante la observación diaria de los animales, o a través de la prueba de elevación de la cabeza con liberación súbita (*Head Raising Test –HRT-*) (Pienaar et al. 1976). Una vez finalizado el protocolo experimental, se procedió a la eutanasia de los animales por sobredosis de solución intravenosa de tiopental sódico.

Necropsia y toma de muestras. Se procedió a la necropsia y toma de muestras del Sistema Nervioso Central, ganglios espinales, hígado, riñón, corazón, pulmón y bazo. Registrándose en la ficha clínica individual cualquier dato relevante para los análisis posteriores. Para este estudio se centró el estudio en los cambios observados en la corteza cerebelosa.

Histopatología y lectinohistoquímica. Se tomaron secciones de diferentes regiones del cerebelo (vermis, lóbulos laterales y lóbulo floculonodular). También se procesaron muestras de otras regiones del SNC, ganglios espinales, hígado, riñón, corazón, pulmón y bazo en búsqueda de lesiones histopatológicas en estos órganos, que no se presentan como parte de este estudio por no haberse encontrado hallazgos microscópicos a destacar.

Histopatología. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% (pH 7,4), deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, xilol, incluidas en parafina, cortadas a 5 µm y teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) para el diagnóstico histopatológico y con solución de Azul de Toluidina al 1% como técnica complementaria para el recuento de células de Purkinje cerebelosas. Se procedió como parte del trabajo de tesis a la revisión de estas láminas para identificar las posibles alteraciones y cuantificación de las lesiones encontradas en cortes seriados, tomándose uno de cada cinco cortes realizados en el micrótopo (Leitz modelo 1512, Alemania), en cada uno de estos cortes se contaron las células de Purkinje de la corteza cerebelosa en 400 campos a alta resolución (400x) en microscopio de luz transmitida (Olympus BX41, Japón) en 10 láminas de muestras de corteza cerebelosa de cada animal de acuerdo a Verdes et al. (2006).

Lectinohistoquímica. También en muestras fijadas en formol tamponado al

10% (pH 7.4) y procesadas de igual forma a lo descrito anteriormente, sin llegar a la etapa de tinción, se desarrolló el protocolo de lectinohistoquímica indirecta. Para ello, se utilizó el kit de 9 lectinas biotiniladas (ConA, SBA, s-WGA, WGA, DBA, UEA-1, RCA, PNA, BS-1) con alta afinidad a diferentes residuos glucídicos (Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante y el protocolo recomendado por Perfumo et al. (2000). En la Tabla 1 se muestra un resumen de las afinidades por carbohidratos específicos de cada una de las lectinas utilizadas en el kit (de acuerdo con Sant'Ana et al. 2011).

Tabla 1. Lectinas usadas en el estudio histoquímico y sus principales afinidades por residuos de sacáridos

Acrónimo	Fuente	Afinidad principal ^a
Con A	<i>Concavalina ensiformis</i>	α - manosa
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	α - N-acetilgalactosamina
SBA	Poroto de soja	α - ó β - N-acetilgalactosamina
PNA	Poroto de maní	galactosil (β -1,3) N-
		acetilgalactosamina
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>	Galactosa ó N-
		acetilgalactosamina
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Residuos de α - fucosa
WGA	Germen de trigo	N-acetilglucosamina
s-WGA	Germen de trigo succinilado	Residuos de ácido siálico
BS-I	<i>Bandeira simplicifolia-I</i>	α -D-galactosa

^a(Sant'Ana et al. 2011)

Análisis estadísticos de los resultados.

Las lesiones halladas en las muestras de tejidos se analizaron usando como medidas de tendencia central la media (\pm e.e.m.) y la mediana para el conteo de células de Purkinje en 400 campos por cada animal (de acuerdo a lo descrito por Verdes et al., 2006), comparando los resultados con los de los animales del grupo control, utilizando para ello el test de Kruskal-Wallis, seguido de test de Mann-Whitney para identificar diferencias entre las medianas de los recuentos obtenidos para cada animal, tomando un $\alpha \leq$

0.05.

RESULTADOS

Planta administrada y confirmación de signos cerebelosos.

Tomando de referencia el total de hojas secas y molidas de *S. bonariense* suministrado hasta la aparición de signos cerebelosos durante el control diario de los animales mediante la prueba HRT (Pienaar et al, 1976), se requirieron 0.524 Kg hojas secas y molidas/Kg Peso Vivo -PV- (equivalentes a 2.251 Kg hojas frescas/Kg PV-), durante 362 días (Figura 3). Los caprinos que fueron positivos al HRT, presentaron además alteraciones de movimientos con temblores de intención y mioclonias, ataxia, aumento de base de sustentación, depresión del sensorio, pérdida del equilibrio ante superficies desconocidas o irregulares, o ante la pérdida de contacto visual de las mismas, disminución de respuesta al reflejo de amenaza, ausencia de saltos y resistencia a encabritarse -que se define como pararse en sus patas traseras para explorar el entorno o alcanzar objetos o alimentos por encima de su cabeza, siendo este un comportamiento normal de los caprinos, también denominado en inglés como *rearing up*).

En la tabla 2 se muestra un resumen de los datos de la intoxicación experimental de los caprinos utilizados.



Figura 3. Cabra 4 luego de recibir 0.524 Kg/PV Planta seca y molida durante 362 días, mostrando en la secuencia de fotos durante la realización de la prueba HRT caída sin pérdida de conciencia y recuperación luego de unos segundos (positividad a alteración cerebelosa de acuerdo con Piennar et al. (1976).

Tabla 2. Resumen de la cantidad de planta suministrada y porcentaje de dosis con respecto a la dosis de inducción de signos cerebelosos por HRT

# Cabra	Kg/PV Planta seca y molida	Kg/PV ¹ Planta fresca	Kg/PM ² planta Fresca	Respuesta HRT	% dosis inducción signos cerebelosos
Control	-	-	-	Negativo	-
Control	-	-	-	Negativo	-
1	0,136	0,584	1,497	Negativo	34
2	0.203	0,871	1,790	Negativo	37
3	0.437	1,878	4,245	Negativo	87
4	0.524	2,251	4,875	Positivo	100
5	0.446	1,916	5,096	Positivo	106

¹Equivalente de planta fresca/Kg de peso vivo (calculado la relación entre el rendimiento de la planta seca y molida a partir del peso fresco).

²Equivalente de planta fresca /Kg de peso metabólico, calculado como: Peso Metabólico = (Peso Vivo)^{0,75}.

Hallazgos anatomopatológicos.

Examen *post-mortem*

A la necropsia los animales no presentaron alteraciones destacables en ninguno de los casos estudiados, incluso en aquellos animales en los que se reprodujeron signos cerebelosos por la prueba de HRT (tabla 2).

Histopatología

La histopatología mostró solamente alteraciones destacables en la corteza cerebelosa, siendo la lesión principal la acumulación microvesicular y el hinchamiento del pericario de las células de Purkinje afectadas, en muchos de estos casos se identificaron núcleos en diferentes grados de alteración (picnosis, cariorexis y cariólisis). En una misma folia cerebelosa se podían observar células de Purkinje con diferente grado de alteración, observándose neuronas hinchadas, otras necróticas y algunas otras con núcleo y citoplasma de aspecto normal tanto con la tinción HE (Figuras 4 y 5) como con la de Azul de Toluidina –AT- (Figuras 6 y 7).

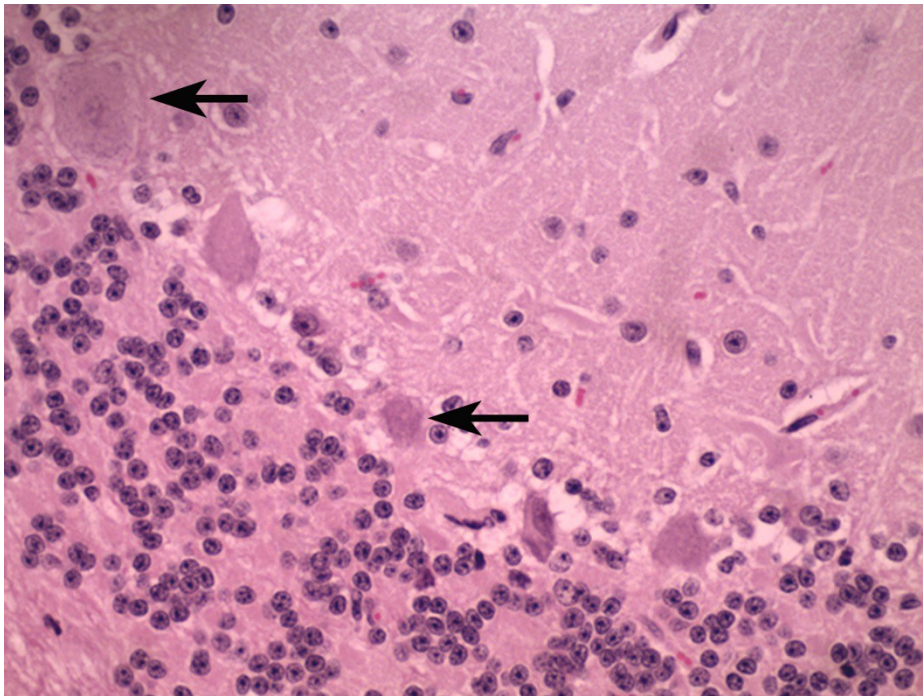


Figura 4. Corteza cerebelosa de Cabra 4. Las flechas señalan diferentes grados de degeneración de neuronas de Purkinje (tinción HE, 400 x).

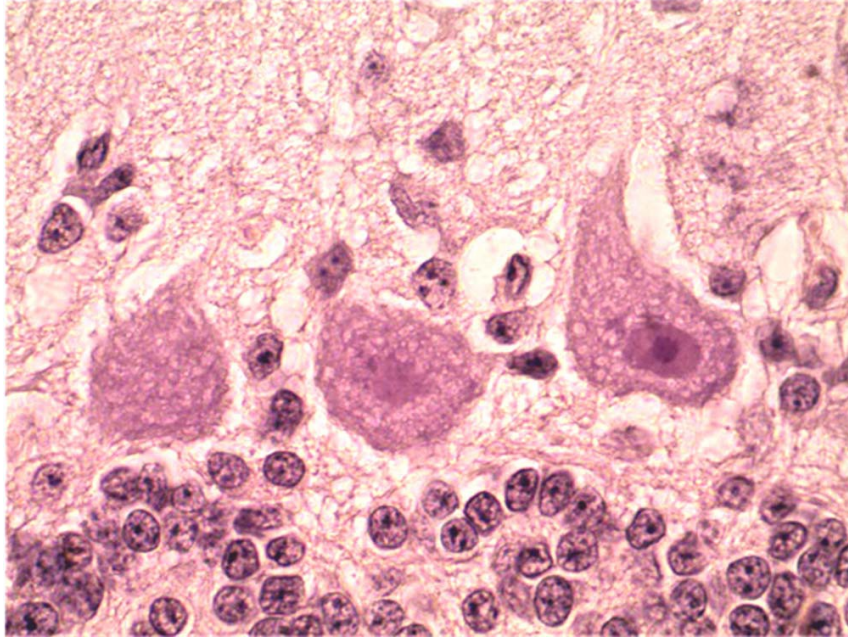


Figura 5. Corteza cerebelosa de Cabra 1. Detalle de acúmulo vesicular en células de Purkinje en diferente grado de degeneración (tinción HE, 1000 x).

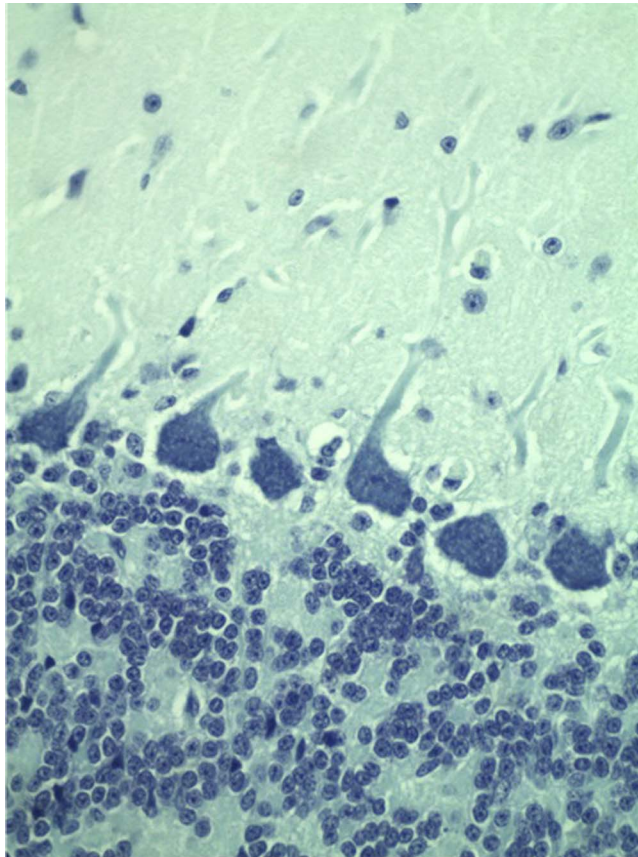


Figura 6. Corteza cerebelosa de Cabra 1. Se observan células de Purkinje en diferentes grados de degeneración (tinción AT, 400 x).

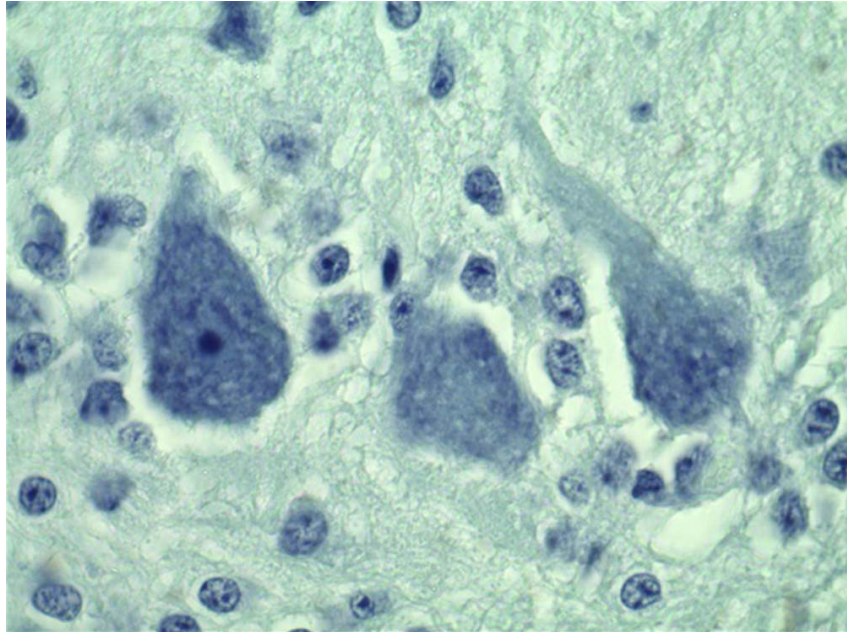


Figura 7. Corteza cerebelosa de Cabra 1. Detalle de acúmulo vesicular en células de Purkinje en diferente grado de degeneración (tinción AT, 1000 x).

Lectinohistoquímica

En cuanto al estudio de lectinohistoquímica, existieron diferencias para algunas de las lectinas utilizadas en la corteza cerebelosa de los animales intoxicados experimentalmente frente a los controles. La marcación del pericario de las células de Purkinje mostró una mayor intensidad de marcación contra las lectinas Con-A, sWGA y WGA, aunque este patrón no resultó característico de la acumulación de algún sacárido específico en el interior del pericario de estas neuronas. Los detalles de la semi-cuantificación de los diferentes grados de intensidad se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Intensidad de reacción en la unión de diferentes lectinas en células de Purkinje en cortes de cerebelos de animales intoxicados y normales

	Con-A	DBA	SBA	PNA	RCA-I	LEA-I	WGA	sWGA	BS-I
intoxicado	2 *	0	0	0	1	0.2	3 *	3 *	0
control	1	0	0	0	0	1	1	1	0

*Los números indican la intensidad de tinción, siendo el 0 no reactivo y el 3 el máximo de reactividad.

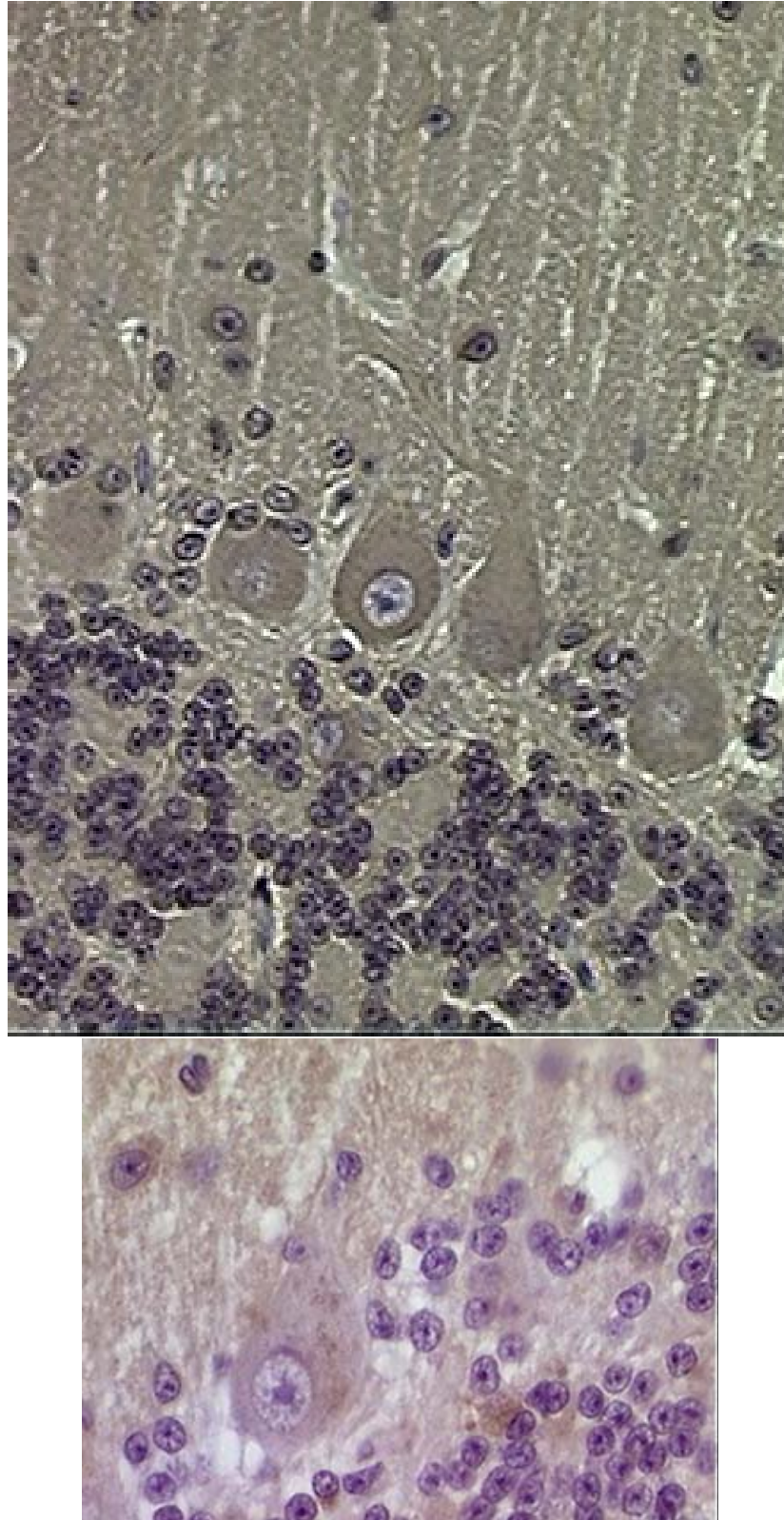


Figura 8. Corteza cerebelosa de Cabra 4. Obsérvese la marcación fuerte a Con-A (A) y sWGA (B) en el pericario de las células de Purkinje del animal intoxicado (LHQ, contraste hematoxilina de Harris, 400 x).

Recuento de células de Purkinje y análisis estadístico de los resultados.

Tanto en los animales controles como en los animales afectados, se contaron 400 campos visuales a 400 x para definir los valores medios de la población de las células de Purkinje.

En los controles, la media de células de Purkinje fue de $4,922 \pm 0.081$, mientras que la mediana fue de 5 neuronas por campo respectivamente. Para el caso de los animales intoxicados, los animales 1 y 2 (con dosis de hojas inferiores al 40% de aparición de signos cerebelosos), la media de células de Purkinje fue de $4,968 \pm 0.081$, mientras que la mediana fue también de 5 neuronas por campo. El animal 3 que consumió el 87% de la dosis, presentó una media de $4,305 \pm 0.083$, y una mediana de 4. Finalmente, los animales 4 y 5, que llegaron a consumir dosis iguales o superiores a la requerida para inducir signos cerebelosos confirmados por HRT, presentaron una media de $3,915 \pm 0.055$, y una mediana de 4 neuronas por campo.

También cabe mencionar que el recuento celular, permitió confirmar que el número de células de Purkinje de aspecto normal se reducía a medida que se aumentaba la dosis de planta suministrada, encontrándose un mayor número de células degeneradas o en proceso de degeneración en los grupos con mayores dosis de planta. El porcentaje de células de Purkinje de aspecto normal fue de 98.25% para el animal control, mientras que en los animales 4 y 5 (con signos cerebelosos) este porcentaje se redujo al 12.5%.

A partir de los datos de tendencia central se confirmó mediante el test de Kruskal-Wallis la existencia de diferencias significativas entre los animales 3, 4 y 5 con respecto a los valores obtenidos para los controles y los animales 1 y 2. En la Tabla 4 se muestran los resultados del estudio estadístico.

Tabla 4. Comparación no paramétrica mediante Kruskal-Wallis, lo que

nos permite comparar entre grupos y ver las diferencias significativas para los diferentes grados de intoxicación en relación a la dosis de inducción de signos cerebelosos

A. Controles (n = 2).

B. Dosis menor a 40% (n = 2).

C. Dosis 87% (n = 1).

D. Dosis mayor o igual a la requerida para signos cerebelosos (n = 2).

** Los grupos C y D difieren muy significativamente de A y B.

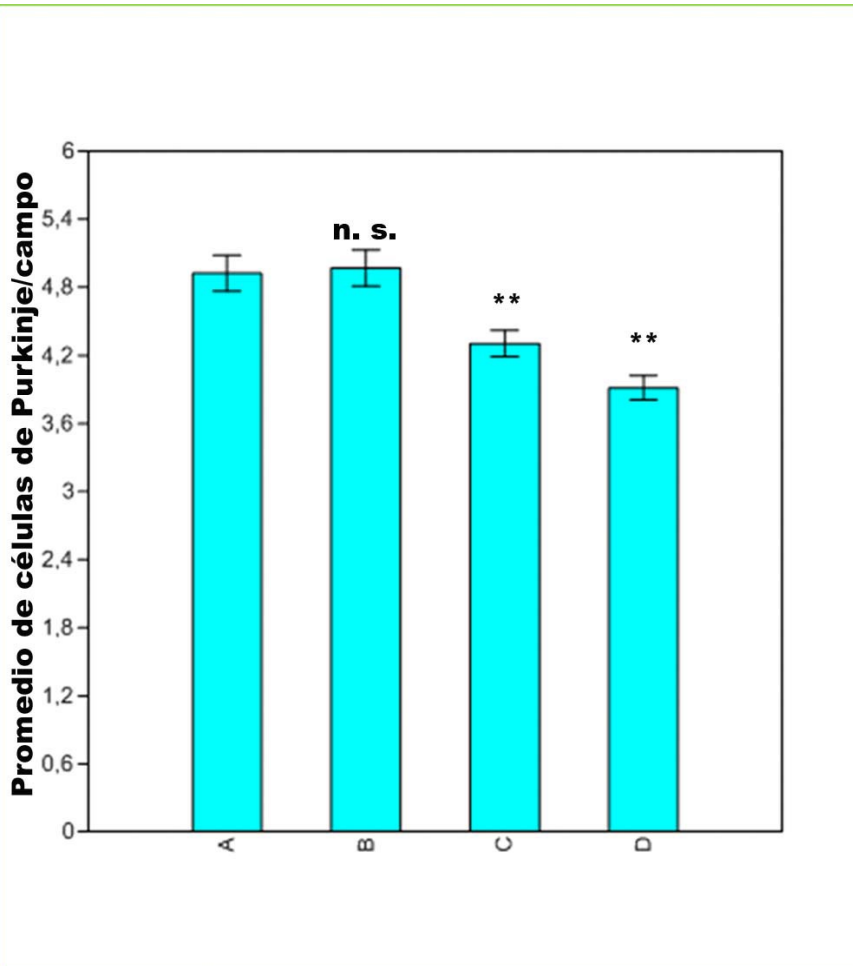


Figura 9. Histograma de barras donde se visualiza las diferencias significativas en el medio (\pm e.e.m.) de disminución del número de células de Purkinje entre los grupos C y D en comparación con A y B.

A. Controles (n = 2). B. Dosis menor a 40% (n = 2). C. Dosis 87% (n = 1). D. Dosis mayor o igual a la requerida para signos cerebelosos (n = 2). ** Los grupos C y D difieren significativamente de A. n.s. = no hay diferencias.

DISCUSIÓN

De acuerdo a reportes previos de posibles intoxicaciones espontáneas de caprinos con otras especies de solanáceas existentes en Australia (Bourke, 1997) y en EE. UU. (Porter et al., 2003), nuestro trabajo confirmó experimentalmente la toxicidad de *S. bonariense* para la especie caprina, reforzando los reportes de casos espontáneos en caprinos ocasionados por la ingestión de *S. cinereum* (Bourke, 1997) y *S. viarum* (Porter et al., 2003), demostrando por primera vez la relación causa/efecto entre el consumo controlado de *S. bonariense* y la aparición de signos cerebelosos en el caprino (Verdes et al., 2013). Además, se confirmó la dosis requerida de planta para desencadenar los signos antes mencionados, los que se confirmaron mediante el uso del HRT como herramienta, de acuerdo a lo demostrado previamente para bovinos por otros autores (Verdes et al., 2006; Riet-Correa et al., 1983; Pienaar et al., 1976), siendo este el primer trabajo que demuestra también su utilidad en condiciones experimentales en caprinos. Así mismo se constató la alteración de otros componentes del comportamiento locomotor de los caprinos intoxicados experimentalmente. Entre otros, aparición de temblores de intención, mioclonias, ataxia, aumento de base de sustentación, depresión del sensorio, pérdida del equilibrio ante superficies desconocidas o irregulares, o resistencia al encabritamiento (o *rearing up*), así como disminución de respuesta al reflejo de amenaza y ausencia de saltos. Esta presentación sintomática fue similar a la reportada previamente por otros autores para bovinos intoxicados experimentalmente (Verdes et al. 2006; Riet-Correa et al., 1983), aunque debido al mayor despliegue locomotor de la especie caprina respecto a la bovina, se observaron por primera vez, la aparición de algunos signos de alteración cerebelosa que son propios de los caprinos y no se observan en bovinos.

También para los caprinos, se confirmó la dependencia de la dosis de planta

suministrada para la aparición tanto de los signos cerebelosos, como hallazgos histopatológicos característicos de esta intoxicación descritas previamente para los bovinos (Verdes et al., 2013; 2006; Riet-Correa et al., 1983).

De acuerdo con el tiempo utilizado en la reproducción experimental de la intoxicación, y de forma similar a lo reportado previamente por otros autores (Verdes et al., 2006; Riet-Correa et al., 1983), para el caso de los caprinos utilizados en este trabajo, se requirió de tiempos prolongados de consumo de la planta, demostrándose el carácter progresivo, crónico e irreversible de los daños ocasionados por su consumo en condiciones experimentales.

Los animales utilizados en este trabajo, solamente presentaron signos cerebelosos, sin que hubiera otros signos que pudieran llevar a los animales al empeoramiento de su condición corporal o la muerte, tal como se describe en otras plantas que contienen swansonina y que ocasionan la enfermedad de acúmulo lisosomal denominada α -manosidosis adquirida, que presenta alta mortalidad y acúmulo lisosomal en otros órganos y tejidos, como ser: páncreas, hígado, riñón, tiroides, así como el SNC y SNP (Stegelmeier et al., 1999).

El examen *post-mortem* de los animales no reveló hallazgos macroscópicos que nos permitan hacer un diagnóstico de la intoxicación (Verdes et al., 2006).

En cuanto al diagnóstico histopatológico, los hallazgos específicos de la corteza cerebelosa afectaron particularmente a las células de Purkinje en todas las áreas del cerebelo, las que sufrieron una desaparición progresiva y dependiente de la dosis de planta suministrada, tal como plantean otros autores para el caso de los bovinos intoxicados espontáneamente o en forma experimental (Verdes et al., 2006; Riet-Correa et al., 1983).

En cuanto a la utilización complementaria de la lectinohistoquímica, tal como lo han reportado previamente otros autores para bovinos intoxicados de forma natural o experimental (Sant'Ana et al., 2011; Paulovich et al. 2002), para el caso de los caprinos de este trabajo, el patrón lectinohistoquímico no se ajusta a lo previamente descrito de forma específica para enfermedades de acúmulo lisosomal tales como α -manosidosis adquiridas (Stegelmeier et al., 1999).

Dentro de las lesiones halladas en este estudio, se confirmó la disminución del número de células de Purkinje, con la identificación de acúmulo

micro-vesicular en el pericarion de las neuronas remanentes, pero a diferencia de lo reportado en los bovinos intoxicados natural o experimentalmente (Verdes et al., 2006; Riet-Correa et al., 1983), no se observaron esferoides axonales en la capa granulosa o en la sustancia blanca cerebelosa, lesiones reportadas como típicas de la intoxicación de los bovinos con *S. bonariense* (Verdes et al., 2006; Riet-Correa et al., 1983).

Este es el primer trabajo que confirma la toxicidad experimental de *S. bonariense* para los caprinos, siendo el primero que apoya de forma experimental los reportes previos de degeneración cerebelosa espontánea en caprinos ocasionada por otras solanáceas (Bourke et al, 1997; Porter et al, 2003). Además, se caracterizó de forma experimental las fortalezas y debilidades del uso de esta especie como modelo animal para el estudio de la degeneración cortical cerebelosa ocasionada por la ingestión de *S. bonariense* en bovinos que ha sido previamente reportada por otros autores (Verdes et al. 2006; Riet-Correa et al., 1983).

CONCLUSIONES

- El *Solanum bonariense* resulta toxico para los caprinos, debiendo ingerir grandes cantidades de planta, por periodos de tiempo prolongados, para ocasionar la aparición de signos cerebelosos y lesiones histopatológicas específicas.
- Los signos cerebelosos que presentaron los caprinos contaron con algunas particularidades específicas de la especie estudiada, pero al igual que para los bovinos, la prueba HRT resultó útil para identificar la afectación cerebelosa.
- Los resultados histopatológicos de los cerebelos de los caprinos intoxicados, fueron similares a los reportados previamente en los bovinos intoxicados tanto natural como experimentalmente, aunque en las dosis utilizadas parecen menos severos, al no identificarse una pérdida tan marcada de células de Purkinje, ni la presencia de esferoides axonales en la capa granulosa o en la sustancia blanca cerebelosa.

- En cuanto al uso de la Lectinohistoquímica, los patrones de marcación de las lectinas en caprinos fueron similares a lo reportado en bovinos, aunque no fueron específicos para identificar el tipo de acúmulo presente en las microvesículas del pericario neuronal, como perteneciente a un residuo glucídico en particular, tal como se reporta para otras enfermedades de acúmulo lisosomal ocasionadas por plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alroy, J., Goyal, V. y Warren, C.D.(1988). Lectin histochemistry of gangliosidosis. I. Neural tissue in four mammalian species. *Acta neuropathologica*, 76,109-14.

Alroy, J., Ucci, A.A., Goyal, V. y Woods, W.(1986). Lectin histochemistry of glycolipid storage on frozen and paraffin-embedded tissue sections. [*Journal of Histochemistry & Cytochemistry*](#),34, 501-505.

Baker, D.L., Keeler, R.F. y Gaffield, W. (1989). Pathology in hamsters administered Solanum plant species that contain steroidal alkaloids. *Toxicon*, 27:1331-1337.

Bourke, C. A. (1997).Cerebellar degeneration in goats grazing *Solanum cinereum* (Narrawa burr). *Australian Veterinary Journal*, 75(5),363-365.

Cunningham, J.G. (2003). *Fisiología Veterinaria*(3ª ed.). Madrid: Elsevier

Damjanov,I. (1987).Lectin cytochemistry and histochemistry. *Laboratory Investigation*, 57, 5-20.

De Maria, R., Rippo, M.R., Schuchman, E.H. y Testi, R.(1982). Acidic spingomyelinase (AMS) in necessaty for fas-induced GD3 ganglioside

accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *Journal of Experimental Medicine*,187,897-902.

Dreimeier, D., Colodel, E.M., Gimeno, E.J. y Barros, S.S. (2000). Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Veterinary Pathology*, 37, 153-159.

Guaraná, E. L. S., Riet-Correa, F. Mendonça, C. L., Medeiros, R. M. T.; Costa, N. y Afonso, J. A. (2011). Intoxicação por *Solanum paniculatum* (Solanaceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,31(1), 59-64.

Jolly, R.D. y Walkley, S.U.(1997). Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. *Veterinary Pathology*,34: 527-548.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (1997). *Neurociencia y Conducta*. Madrid: Prentice Hall.

Lima, E.F., Riet-Correa, F. y Medeiros, R.M. (2014). Spontaneous poisoning by *Solanum subinerme* Jack as a cause of cerebelar cortical degeneration in cattle. *Toxicon* 82, 93-96.

Linnaeus, C. (1753). *Solanum bonariense*. *Species Plantarum* 1:185.

Lombardo, A. (1983). *Flora montevidensis: Gamopétalas*. Montevideo: Publicaciones de la Intendencia Municipal de Montevideo.

Menzies, J. S., Bridges, C. H. y Bailey, E. M. A. (1979). Neurological disease of cattle associated with *Solanum dimidiatum*. *Southwestern Veterinarian*, 32(2),45-49.

Mumane, R.D., Ahern-Rindell, A.J. y Prieur, D.J.(1989). Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease whit deficiencies of beta-galactosidase and alpha-neuraminidase. *American Journal of Pathology*. 135,623-30.

- Paulovich, F.B., Portiansky, E.L., Gimeno, E.J., Schild, A.L., Méndez, M.C. y Riet-Correa, F. (2002). Lectin histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49,473-477.
- Pienaar, J. G., Kellerman, T. S., Basson, P. A., Jenkins, W. L. y Vahrmeijer, J. (1976).Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N. E. Br. *Onderstepoort. Journal of Veterinay Research*, 43(2), 67-74.
- Porter, M. B, Mackay. R. J, Uhl. E., Platt, S. R. y De Lahunta, A.(2003). Neurologic disease putatively associated with ingestion of *Solanum viarum* in goats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 223(4),501-504.
- Riet-Correa, F. y Medeiros, R.M.T.(2001). Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para saúde pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 21,38-42.
- Riet-Correa, F.; Mendez, M. D., Schild, A. L., Summers, B. A. y Oliveira, J. A. (1983).Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. *Cornell Veterinarian*, 73(3), 240-256.
- Sant'ana, F. J. F., Barbeito, C. G., Nishida, F., Gimeno, E. J., Verdes, J. M.; Battes, D... Barros, C. S. L. (2011).Clinical and pathological aspects and cerebellar lectin binding in cattle poisoned with *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* and *Solanum bonariense*. *International Journal of Poisonous Plants Research*, 1(1) 28-34.
- Stegelmeier, B.L., James, L.F., Panter, K.E., Gardner, D.R., Pfister,J.A., Palphs, M.H., y Molyneux, R.J. (1999). Dose response of sheep poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11,448-456.
- Summers, B.A., Cummings, J.F. y De Lahunta ,A. (1995). *Veterinary*

Neuropathology. Mosby-Year, Inc., USA. 527p.

Van Der Lugt, J.J., Bastianello, S.S., Van Ederen, A.M., y Van Wilpe, E. (2010). Cerebellar cortical degeneration in cattle caused by *Solanum kwebense*. *The Veterinary Journal* 185. 225–227

Vázquez, A. (1997). *Química y biología de las Solanáceas*, (Tesis de Doctorado inédita). Facultad de Química, UDELAR.

Verdes, J. M.; Dehl, V., Borteiro, C., Dura., L., Gimeno, E. J., Guidi, M. G... Moraña, A.(2013). Toxicopathological characterization of the goat as an animal model of bovine cerebellar cortical degeneration induced by *Solanum bonariense*. *Journal of Comparative Pathology*, 148(1), 58.

Verdes, J.M., Márquez, M., Calliari, A, Battes, D., Moraña J.A., Gimeno, .EJ... Pumarola, M. A(2015). novel pathogenic mechanism for cerebellar lesions produced by *Solanum bonariense* in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic*. 27, 278-86.

Verdes, J. M., Moraña, A., Gutiérrez, F. Battes, D., Fidalgo, L. E. y Guerrero, F. (2006). Cerebellar degeneration in cattle grazing *Solanum bonariense* (Naranjillo) in Western Uruguay. *Journal of Veterinary. Diagnostic Investigation*, 18 (3), 299-303.

Verdes J.M. Moraña, J.A., Battes, D., Gutiérrez, F., Guerrero, F., Goicioa, A ... Gimendo, E.J.(2010). Calbindin D28k expression and the absence of apoptosis in the cerebellum of *Solanum bonariense* L-intoxicated bovines. *Veterinary Pathology*. 47, 569-571.

Verdes, J.M., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T., Moraña, A., Battes, D., Borteiro, C ... Barros, S.S.(2012). Cerebellar Cortical Degeneration in Cattle Poisoned With *Solanum* spp. In South America: an Epidemiological, Clinicopathological, Pathological, and Toxicological Review. *International Journal of Poisonous Plants Research* , 2, 34-44.