

= UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA =
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL ENTEQUE SECO EXPERIMENTAL
EN RATAS Y REVISION BIBLIOGRAFICA DE LAS CALCINOSIS.-

-oOo-

Presentado por:

EDUARDO JUAN GIMENO

Director:

Profesor Doctor Jorge RUAGER

= L A P L A T A =

-ooOoo-

= UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA =
= FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS =

* * *

DECANO:

Profesor Dr. JOSE HUGO FERNANDEZ DE LIGER

DECANO SUSTITUTO:

Dr. Néstor Angel MENENDEZ

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. Jorge Eugenio LED

SECRETARIO ADMINISTRATIVO:

Sr. Omar Hugo RAMIREZ

= 1 9 7 7 =

- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL ENTEQUE SECO EXPERIMENTAL
EN RATAS Y REVISION BIBLIOGRAFICA DE LAS CALCINOSIS.

-oo0oo-

Eduardo Juan GIMENO.

1977. _____

= I N D I C E =

	pag.
A. INTRODUCCION. IMPORTANCIA Y OBJETIVOS. _____	15
B. ENTEQUE SECO Y OTRAS CALCINOSIS. REVISION BIBLIOGRAFICA. _____	17
I) Argentina. Entequete seco osificante, Entequete seco o Guata-i. _____	17
II) Brasil. Espichamiento o Espichaço. _____	32
III) Hawaii. Enfermedad de Naalehu (Naalehu Disease)	35
IV) Jamaica. Enfermedad Emaciante de Manchester. (Manchester Wasting Disease). _____	37
V) Austria. Calcinosis de los Bovinos (Kalzinose der Rinder). _____	38
VI) Alemania. Calcinosis Enzoótica en Bovinos (Enzootische Kalzinose beim Rind). _____	43
VII) Israel. Calcinosis en Cabras (Calcinosis in Goats). _____	52
VIII) Sud Africa. Calcinosis Enzoótica de los Ovinos (Enzootic Calcinosis of Sheep). _____	53
IX) India. Calcinosis Enzoótica en Ovinos. (Enzootic Calcinosis in Sheep). _____	53
X) Nueva Guinea. Calcinosis Enzoótica en Bovinos. (Enzootic Calcinosis of Cattle). _____	54
XI) E.E.U.U. Intoxicación por Cestrum diurnum. (Cestrum diurnum Poisoning). _____	55
XII) Uruguay. Calcificación Metastásica Enzoótica en Bovinos. (Entequete Seco). _____	58
C. METABOLISMO Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA VITAMINA D.	59
I) Generalidades. _____	59
II) Metabolismo. _____	60
III) Efectos biológicos y mecanismo de acción de la 1,25 dihidroxivitamina D ₃ . _____	61
a) En el intestino.	
b) En el tejido óseo.	
c) En otros tejidos.	

	pág.
D. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON BUNAZHILLO BLANCO (<i>SOLANUM GLAUCOPHYLLUM</i> , <i>SOLANUM MALACOTRYLON</i> O <i>SOLANUM GLAUCUM</i>). _____	63
Revisión Bibliográfica. _____	63
E. CALCINOSIS EXPERIMENTAL EN RATAS. _____	89
I) Resumen. _____	89
II) Antecedentes e Introducción. _____	89
III) Material y Métodos. _____	91
IV) Resultados. _____	94
a) Manifestaciones Clínicas. _____	94
b) Hallazgos de Necropsia. _____	102
c) Estudio Microscópico. _____	104
V) Conclusiones. _____	116
F. DISCUSION. _____	117
G. RESUMEN. SUMMARY. _____	125
H. BIBLIOGRAFIA. _____	127

"VE DE ERRATAS"

- Pág. 13-renglón 4º, donde dice: "entegue seco osificante" debe decir: "entegue osificante".
- Pág. 19-renglón 2º, donde dice: "amanción" debe decir: "amaciación".
- Pág. 37-renglón 27º, donde dice: "como responsable por la presencia..." debe decir: "como responsable de la afección, pero señala que podría ser acentuado por la presencia de...".
- Pág. 35-renglón 9º, donde dice: "cardiopatías" debe decir: "condropatías".
- Pág. 39-renglón 20º, donde dice: "cauli" debe decir: "cauli".
- Pág. 46-renglón 21º, donde dice: "binos" debe decir: "bovinos".
- Pág. 50-renglón 27º, donde dice: "calcinogénica" debe decir: "calcinogénica".
- Pág. 57-renglón 1º, donde dice: "versas" debe decir "diversas".
- Pág. 71-renglón 21º, donde dice: "ultravioleta" debe decir: "ultravioleta".
- Pág. 71-renglón 3º, donde dice: "ocoso" debe decir "ocoso".
- Pág. 99-foto 4, donde dice: "izquierda" debe decir: "derecha" y viceversa.
- Pág. 100-renglón 2º, donde dice: "flasa" debe decir: "falsa".
- Pág. 104- renglón 13º, donde dice: "disposiciones" debe decir: "deposiciones".
- Pág. 107-foto 11, donde dice: "circunstancia" debe decir: "circunferencia".
- Pág. 116-renglón 16º, donde dice: "clacinosis" debe decir: "calcinosis".
- Pág. 124-renglón 28º, donde dice: "oxidativa de otros autores" debe decir: "oxidativa. Como resultado de hallazgos propios y de otros autores...".

A. INTRODUCCION. IMPORTANCIA Y OBJETIVOS

La reciente identificación del principio activo del duraznillo blanco (*Solanum glaucophyllum*, Desf. 1829; *Solanum malacoxylon*, Sendtner, 1846 o *Solanum glaucum*, Dunal 1852), y el descubrimiento de otras especies vegetales con efectos biológicos calcinogénicos, plantean la necesidad de reconsiderar el problema. "Se calcula que unos 3.000.000 de bovinos resultan afectados de Enteque Seco anualmente en Argentina" (Köhler y Libiseller, 1970) cifra que estimamos debe ser bastante mayor. Si paralelamente se toma en consideración el empleo potencial del *Solanum malacoxylon* en terapéutica humana y animal, sugerido por varios autores (Haussler, Wasserman, Mc Cain, Peterlik, Bursac y Hughes, 1976; Wasserman, 1975; von Herrath, Kraft, Offermann y Schaeffer, 1974; y otros); queda claramente en evidencia la trascendencia del tema.

Con el presente Trabajo de Tesis se persiguen varios objetivos; demostrar que es posible obtener lesiones de calcificación en tejidos blandos de ratas mantenidas con una dieta carente de vitamina D por efecto del *Solanum malacoxylon*, y estudiar esos cambios fundamentalmente a nivel microscópico.

Así mismo he incluido los nombres de todos los profesionales de distintas especialidades y países que, según es de mi conocimiento, escribieron sobre el tema; pretendiendo con ésto, facilitar la búsqueda bibliográfica a quienes en el futuro investiguen sobre el particular.- Por posibles omisiones involuntarias pido anticipadamente disculpas.

Esa revisión cronológicamente ordenada, se realiza especialmente en el capítulo B, con especial referencia a las consideraciones respecto a causa-efecto propuestas a

través de los años.

El capítulo C ofrece una somera revisión actualizada del metabolismo y funciones de la vitamina D. No pretende ser, de ningún modo, una completa consideración del tema; la única finalidad que reconoce, es facilitar al lector la comprensión de los capítulos siguientes.

El resumen de los trabajos experimentales con *Solanum malacoxylon* y los efectos biológicos demostrados, es sin duda el capítulo que más dificultades ofrece. La razón es fácilmente comprensible por la cantidad y sofisticación crecientes de las investigaciones realizadas desde 1967 en adelante.

En el capítulo E se describe la reproducción experimental de lesiones características del "Enteque Seco" en ratas carenciadas en vitamina D por administración oral repetidas de extracto acuoso de *Solanum malacoxylon*.

En la discusión final se comprendían los conocimientos actuales referidos a etiología y patogenia del "Enteque Seco", los cuales están terminando con algunas discusiones que durante años ha apasionado a Veterinarios de todo el mundo.

Este modesto aporte a las Ciencias Veterinarias de mi Patria, está dedicado a la Memoria de Don Roberto Juan Gimeno, mi Padre, fallecido en Pigüé el 6 de julio de 1976; por el tiempo en que este trabajo empezaba a cristalizar en la Universidad de Munich. De sus caros principios Honradez y Veracidad, he tratado de ser celoso custodio.

. . .

B. ENTEQUE SECO Y OTRAS CALCINOSIS. REVISION BIBLIO -
GRAFICA.

I) Argentina. Entequ Osificante, Entequ Seco o Guata-f

No se sabe con certeza desde cuando el vulgarmente llamado "Entequ Seco" es reconocido en nuestro país. Lignieres (1898) (153) siempre fué considerado como el primero en escribir sobre el particular (Thoinet y Masselin, 1902) (242), pero el mismo Lignières manifiesta en un trabajo posterior (1912) (154) que "la enfermedad era conocida mucho antes de mi llegada a Buenos Aires".- Ya en 1896 Sívori describe lesiones de osificación pulmonar en bovinos (236), Según Forgeot (87) el "Entequ" fué / estudiado en Argentina por Even y Lignières, lamentablemente sin especificar las fuentes de esa información Teodoro Kitt manifiesta en 1906 (128) que "Even y Cape encontraron el tejido conjuntivo pulmonar intravesicular e interlobular calcificado y osificado en bovinos de Argentina". Esa información la recogen también Lubarsch y Ostertag (156), pero tampoco se conoce su procedencia.

En su primer trabajo se inclina Lignieres por considerar a la afección como una Pasteurelosis crónica que podía presentarse en dos formas: intestinal o caquéctica; la nombrada en segundo término coincide en líneas generales con la enfermedad que nos ocupa.

Las discusiones respecto a la etiología comenzaron ya en aquellos lejanos tiempos. Sívori (1911) pone en duda las conclusiones de Lignières por considerar a las pruebas insuficientes, inclinándose por una intoxicación aguda producida por una toxina del bacilo Preisz-Nocard (237).

El mismo Lignieres responde a la crítica, y si /

bien dice que falta "determinar la causa íntima de esas verdaderas epidemias de arteriosclerosis", las atribuye a una afección intestinal. (154)

En tres novillos provenientes de nuestro país, y sacrificados en Basilea, Suiza; realiza Zschokke (1919), concienzudos estudios microscópicos. Las deposiciones minerales macroscópicamente manifiestas, mostraron ser focos de osificación heterotópica; el proceso es considerado por ese autor como de "osificación metaplástica".(270)

En 1926 y 1927, W.A. Collier, profesional que desempeñaba funciones en el Laboratorio de Bacteriología (Director Profesor Dr. Ruppert) del Ministerio de Agricultura de la Nación, publicó sus estudios sobre el "Enteque" de los bovinos. (43-44) Fue esta una investigación pionera que definió a la afección y que mostró hace 50 años con toda claridad, el camino para el total esclarecimiento de su etiopatogenia. Estas conclusiones, publicadas en dos idiomas, no fueron valoradas en su momento en su real importancia; en consecuencia, reencontrar la senda correcta costó 40 años, muchos desvelos y no poco dinero. Pero veamos en resumen los conceptos vertidos por un Funcionario de nuestro Gobierno Nacional en 1927.

Define el término "Enteque" como derivado de "Enteco", esto es: débil, enfermizo, magro, falta de fuerzas. Para la forma de Enteque estudiada por Lignieres así como por Nocard y Leclainche, y debida al parecer a un proceso infeccioso; propone la denominación de "Enteque Septicémico". Otra forma de Enteque, estudiada por Rosenbuch, es señalada como "Enteque Parasitario". Finalmente reconoce lo que según sus conclusiones debería llamarse "Enteque Osificante".

Respecto a la sintomatología clínica y lesiones

menciona Collier: cifosis, marcha lenta, aberraciones del gusto, respiración corta y acelerada, emanación, atrofia muscular, disminución del tejido adiposo, calcificaciones pulmonares y aórticas. En las calcificaciones pulmonares, comprueba histológicamente osteoblastos y osteoclastos y agrega que "en todos los casos se constata una verdadera osificación del tejido conjuntivo y de los alveolos de los pulmones". En marzo y abril de 1926 realiza estudios en la estancia "La Flecha" de Dolores. Por la eosinofilia normal y los hallazgos de necropsia descarta terminantemente un proceso de origen parasitario. Incubando sangre de animales afectados en suero durante 10 días a 37°C, no obtuvo desarrollo bacteriano; considera esta prueba como suficiente para excluir un origen // septicémico. Manifiesta luego, que esa forma de "Enteque" obedece a un cambio en la función de ciertas glándulas endócrinas provocado por una intoxicación". Los animales enfermos "se recuperan si son llevados a campos cercanos al mar. Aunque en esas nuevas condiciones no se curan..., pero siempre es posible llevarlos a un buen estado de alimentación". Y aunque, como él mismo explica: "las lesiones no se curan, pero la progresión en la calcificación queda detenida".

En la génesis de esos procesos se inclina Collier por considerar la existencia de un alcaloide o glicósido vegetal. Los animales estudiados en Dolores en 1926, provenían en todos los casos de un potrero en el cual los animales beben "en una laguna cubierta de cañas"; por este detalle podemos suponer que se trata de los suelos bajos y cenagosos llamados "entecadores" con posterioridad. "En segundo lugar, debe tomarse en cuenta que en el potrero atacado existen enormes cantidades del Duraznillo blanco, nombre que se aplica a dos plantas distintas

que son: *Solanum glaucum* y *Oxypetalum solanoides*, según la amable clasificación efectuada por el Profesor Molfino". En ese párrafo, hace más de medio siglo, se planteaba por primera vez la posible relación entre el Duraznillo Blanco y el Enteque Seco. Agrega que sería verosímil imputar a ese vegetal, si bien es cierto que los animales no lo ingieren por regla general, pero si lo hacen en períodos de sequía. No habiendo obtenido una cantidad suficiente de *Oxypetalum solanoides*, realiza experiencias con *Solanum glaucum* en conejos, cobayos, palomas y ovejas. Los resultados obtenidos en el campo experimental / son considerados en el capítulo D.

En las conclusiones manifiesta Collier que:

1. "Existen tres diferentes formas de Enteque:
 - A) Enteque septicémico (Septicemia hemorrágica).
 - B) Enteque verminoso (Strongylosis).
 - C) Enteque osificante (Enfermedad causada por una insuficiencia en la secreción de las glándulas endócrinas).
2. El Enteque osificante es causado por el Duraznillo Blanco (*Solanum glaucum* Dunal), que desarregla el sistema de las glándulas endócrinas.
3. Para el tratamiento de Enteque osificante se recomienda separar los animales atacados, cuando aun no están gravemente enfermos, y trasladarlos a terrenos que contengan mucha cal, o agregar simplemente cal a los alimentos".

Según la patogenia postulada por Collier, la ingestión repetida de duraznillo blanco provocaría directa o indirectamente una menor absorción de calcio, por esa razón propone incrementar el tenor de calcio en la alimentación de los animales afectados. Al mismo tiempo el

glicósido o alcaloide vegetal tóxico alteraría el sistema endócrino condicionando trastornos en la circulación sanguínea; a consecuencia de una deficiente irrigación parecerían en pulmones y aorta zonas "calcioafines" de reacción alcalina. La deposición de sales cálcicas en esas áreas estimularía a los osteoblastos allí preexistentes, y de esa forma se presentarían los procesos de osificación (metaplasia conjuntiva).

En 1942 (81, 82) nuevamente son estudiados los efectos tóxicos del duraznillo blanco, aunque al parecer sin considerar una posible relación con el Enteque Seco. Esos trabajos experimentales se comentan en el capítulo D.

Molfino y col.(1955) tratan de relacionar las características edafológicas de los campos con la aparición de la enfermedad. Estudian varios potreros en sus diversos aspectos. Es de destacar que en todos los "lotes críticos" el *Solanum glaucum* se contaba entre las especies vegetales descritas (171).

Rigón (1958 y 1965) describe una vez más las características de los campos entecadores. La enfermedad la atribuía a las evaporaciones producidas en primavera-verano en terrenos semianegados que modificarían el metabolismo, insolubilizando parte del calcio iónico. Comunica que soluciona el problema mejorando la calidad de los suelos. Podemos suponer que un mejor manejo de esos potreros, lo que hacía en realidad, era ofrecer a la hacienda pasturas de calidad en lugar del poco palatable duraznillo blanco (211, 212).

El período en que se postularon distintas hipótesis sobre carencias o desbalances minerales, aparentemente iniciado por Hendershot en 1942 (ver capítulo B,III);

estaba en pleno apogeo.

Bowes (1959) describe una afección en "bovinos, ovinos y quizás equinos", caracterizada por calcificaciones en el sistema cardiocirculatorio, pulmones, aponeurosis y tendones. Determinaciones de calcio, fósforo y magnesio indicaban un desequilibrio mineral, estando afectado especialmente el tenor de magnesio. Comunican además, que la administración oral o parenteral de magnesio ha mostrado buenos resultados (17,18).

Y llegamos a la década del 60, la más polémica, pero también la década en que la etiología resulta esclarecida sobre bases experimentales.

Eckell, Gallo, Martín y Portela, realizan investigaciones al respecto, y en 1960 publican una revisión muy completa de sintomatología y lesiones macro y microscópicas (83). En esa publicación también se plantean diversas hipótesis respecto a la etiología y patogenia que aumentaron el interés sobre la afección, si bien esos autores no se inclinan por ninguna de las posibilidades expuestas. Al respecto ellos mismos manifiestan que consideran "prematuramente formular ninguna teoría por el momento". Entre esas posibilidades, se contempla la eventual existencia de una intoxicación vegetal crónica; en Maipú, gente de campo inculpa como responsable a una gramínea, aún no clasificada en esta investigación, la que crece en los bordes de lagunas y bañados: sostienen que luego de unos 30 días de alimentarse con ella, los vacunos empiezan a presentar síntomas de emaciación".

Dozo y col. (80) consideran como probable una afoforosis. Administrando fósforo obtienen buenos resultados especialmente en los primeros estadios de la enfermedad.

En 1964, Ruager realiza estudios a nivel sanguíneo (217)

en gran número de animales afectados; reporta en resumen: "una ligera hipercalcemia, una anemia de carácter oligocitémico, macrocítico y normocrémico, y una leucopenia no muy marcada. Según el autor, la enfermedad también estaría presente en el Paraguay. (1).

A partir de 1962, se desarrolla un amplio proyecto de investigación que pasaría a jugar un rol decisivo en el esclarecimiento del problema. En él, trabajaron técnicos argentinos y extranjeros; dentro de "un Proyecto Especial financiado por el Gobierno Argentino, con el apoyo del Fondo Especial de las Naciones Unidas, actuando en representación del Gobierno, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (JNTA) en su Estación Experimental de Balcarce (Buenos Aires) y en representación del Fondo Especial de las Naciones Unidas en Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO)". Así definen Carrillo y Worker (38) la naturaleza del Proyecto; que como en esa misma publicación manifiestan, trajo como resultado que se avanzara considerablemente" en los aspectos clínicos, bioquímicos, fisiológicos y patológicos de la enfermedad", permitiendo reconocer su etiología.

Tratando de determinar una posible relación entre la paratuberculosis y el Enteque Seco, se realizaron estudios en 1963 y 1964 (91,92,147); concluyen que la enfermedad de Johne se presenta en áreas entecadoras, pero que es independiente de aquella enfermedad. La relación del mal con parasitosis gastrointestinales también fué considerada (176) y descartada.

Administrando altas dosis de vitamina D en bovinos, Carrillo y col. (1963), encuentran manifestaciones bioquímicas y patológicas similares a las del Enteque Seco (35). Esa posibilidad no la descartan, por el contrario Carrillo

y Worker (1967) manifiestan la necesidad de completar investigaciones al respecto.

En 1964 Bingley enumera posibles etiologías y sus aspectos bioquímicos (13). Por primera vez se plantea la posibilidad de un proceso de calcifilaxis en el Enteque Seco; las concepciones de Selye (1961, 1962)(229, 230), ya eran conocidas en nuestro país; las investigaciones de un funcionario de la Nación realizadas 37 años antes y que contenían la clave del problema, seguían por el contrario olvidadas.

Pero volvamos al Plan FAO/INTA. Los análisis de suelos (246, 16) y aguas (247) de áreas entecadoras y de zonas libres del mal, no mostraron diferencias significativas. El mismo resultado obtienen con los análisis químicos orgánicos y minerales realizados en las pasturas (88, 89).

Quedó de esa forma demostrado que la composición mineral de suelos, aguas y pasturas en las zonas entecadoras no podía considerarse anormal.

No se encuentran variaciones significativas en suero sanguíneo de animales afectados en lo referente a colesterol (174) y ácido siálico (49). Pero sí se demostraron hipercalcemia e hiperfosfatemia en animales mantenidos en potreros entecadores (144).

Pasturas provenientes de áreas problema administradas por fístula ruminal elevan los niveles de calcio y fósforo y los mantienen elevados por cuatro días (143). Esos efectos no se producían al utilizar las cenizas de tales pasturas (102). Después de reconocer a las diversas especies vegetales que componían a esas "pasturas activas" (181) se comprobó que solamente una de ellas, el conocido vulgarmente como durazhillo blanco, fué capaz de producir hi

percalcemia e hiperfosfatemia por administración intraruminal. El esfuerzo y dedicación de ese grupo de investigadores había dado sus frutos. De allí en más se transitaría por la senda que Collier señalara 40 años antes.

El duraznillo blanco fué clasificado como *Solanum malacoxylon* Sendtner en esas investigaciones (22). Sobre / este punto se vuelve al comienzo del capítulo D.

En 1967 se publica el trabajo "Enteque Seco" arteriosclerosis y calcificación metastática de origen tóxico en animales a pastoreo"; en él Carrillo y Worker enfocan el problema en forma integral; este es un trabajo de lectura obligada para quienes se interesan por el tema (38, 39). Recién entonces Collier fue completamente superado.- Quedaba perfectamente definida la capacidad del *Solanum malacoxylon* de provocar alteraciones en la normal regulación del calcio y fósforo; en experiencias preliminares / también lograron producir lesiones de calcificación por administración repetida de ese vegetal. Worker y Carrillo publican en Londres (268) los progresos realizados en el conocimiento de la enfermedad; pasando a constituirse de allí en más en modelo de muchos que en otras partes del / mundo debían enfrentar parecidos problemas. A partir de esas investigaciones se comienza a trabajar con *Solanum malacoxylon* en diferentes especies, no sólo en la Argentina, sino también en el extranjero; esas investigaciones y las asombrosas derivaciones a que dieron origen, se consideraran en conjunto en el capítulo D.

Masselin y Chiaravalle (1965) dan a conocer la frecuencia de la esclerosis aórtica en bovinos de diferentes edades. Examinaron macroscópicamente 38.538 aortas. No encuentran lesiones esclerosas en fetos a término, pero en terneros de 6 a 10 meses de edad el porcentaje ya es ele-

vado (39,5%), llegando en vacas de 3 a 5 años al 66,3%.
(162)

En el año 1968 Zaccardi determina el cuadro electrofonocardiográfico de un bovino atacado de Entequo Seco. (269)

También en 1968 se comunica en EE.UU. (Davis, Cambes y Djafar, 54), que aproximadamente 3.000.000 de bovinos enferman anualmente de Entequo Seco en la Argentina, de los cuales 300.000 van a parar al matadero por esa causa; estos datos los recogen Köhler y Libiseller en 1970 (ver capítulo B, V).

Esa cifra es seguramente mayor; la enfermedad está presente en Entre Ríos (238), en el Chaco (Rauger, observación personal), Corrientes y Formosa.

Pero todavía se dudaba de que el duraznillo blanco fuera realmente la causa de la afección. Debemos situarnos en los años 1967/68; los mismos Carrillo y Worker (1967) manifiestan que no descartan la existencia de otros factores en la etiología de la enfermedad; Willers y colaboradores (265) (Ver capítulo B, III-Hawaii) se inclinan por un desequilibrio mineral; Lynd (157) comunica en la Universidad de Texas que reproduce lesiones de calcificación con una dieta mal balanceada; en Jamaica Arnold (4) seguía postulando la existencia de un desequilibrio calcio/fósforo/magnesio; Onderscheka (183) describe una afección similar (Ver capítulo B, V-Austria) atribuyéndola a una carencia crónica de magnesio. Si bien los estudios de este último autor no se conocían en la Argentina (se lo cita en el país diez años más tarde; 106,107) si estaban difundidas las investigaciones de Hawaii y Jamaica. No es por lo tanto de extrañar que otros investigadores, basándose en observaciones que hace 10 años / no tenían una explicación plenamente convincente, se lan

zaran con entusiasmo a la difícil tarea de determinar la existencia de carencias o desequilibrio minerales en áreas entecadoras, y corregirlas en lo posible.

Un grupo de investigadores integrado en 1968 por Paoli, Gallo, Galofré, Portillo, Torres Moreno, Iseas, Cassagne, a quienes debemos agregar Pereyra, Bajer, Fernandez de Liger y Vidal Aponte, publican en los 4 años siguientes una serie de trabajos en que comunican sus estudios encaminados en esa dirección (95,96,97,98,99,185, // 186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199) Pero veamos muy en resumen cuales fueron los hechos en / que se fundamentaban, y tratemos de explicarlos según los conocimientos actuales. Manifiestan que el desencadenamiento y desarrollo de la enfermedad se encuentran correlacionados directamente a un número de condiciones ecológicas; las áreas entecadoras son zonas geográficas bien delimitadas en suelos deficientes, muy compactos, con alto porcentaje de arcilla y p.H fuertemente alcalino; la enfermedad se acrecienta al comienzo de la estación calurosa, después de fuertes lluvias y al "compactarse la superficie edáfica", la vegetación es entonces de pastos / ralos y duros. Los animales criados en campos entecadores no manifiestan una sintomatología bien definida o directamente no enferman cuando se los alimenta con pasturas provenientes de otras zonas, por el contrario los animales mantenidos en zonas libres de la afección, enferman si reciben pasturas recogidas en las zonas problema. Existirían así síndromes nutricionales por carencias debidas a disturbios de la normal relación suelo-planta-animal.

Respecto al duraznillo no emiten una opinión propia, pero ponen a consideración de los lectores una se-0

rie de observaciones; como por ejemplo la existencia de campos con duraznillo y animales sanos; campos con Entecado Seco y con duraznillos pero en los que la enfermedad no está en relación directa a la cantidad del vegetal; // campos con animales entecados pero sin duraznillo. Además manifiestan que se admite que los animales no lo ingieren naturalmente, y si ello ocurre en forma accidental, una vez caído de la planta, difícilmente lo harían en cantidades equivalentes a las usadas en experimentación. Finalmente se apoyan en los beneficiosos efectos / demostrados por los ficocoloides quelatados con oligoelementos en la prevención y tratamiento de la enfermedad. Los exhaustivos estudios realizados les hacían sospechar de una carencia de manganeso en el suelo ya sea por inmovilización o por lixiviado excesivo.

Entre los años 1963 y 1970 se realizaron ensayos profilácticos-terapéuticos en gran número de animales con ficocoloides quelatados. Desde 1963 hasta 1967 los ensayos realizados en 4.600 animales mediante administración enteral permitieron obtener buenos resultados (98); de la misma forma, los efectos logrados por vía parenteral en 5.000 bovinos fueron promisorios; los autores manifiestan que por el momento no podían sacarse conclusiones definitivas, pero el número de animales que mostró recuperación clínica superó el 90%.

Sobre los temas anteriores, se vuelve más adelante.

Una modesta experiencia fue comenzada en la Cátedra de Patología Médica (Prof.Dr.G.G.Gallo) de nuestra Facultad durante el curso 1973 bajo la dirección de los Auxiliares Docentes Dres, Noseda y Cumba y con la colaboración de algunos alumnos de 4º año (Bardón, Borrajo, Mai

da, Forastieri y Gimeno), esas conclusiones fueron publicadas en 1976 (179). Un bovino experimentalmente intoxicado con *Solanum malacoxylon* fué sacrificado y observadas las lesiones características de la enfermedad; otro animal en las mismas condiciones fué tratado con ficocoloides quelatados. Observamos una recuperación clínica y normalización del cuadro hemático; pero al estudio post-mortem (macro y microscópico), los procesos de calcificación y metaplasia no mostraban signos de regresión, incluso las metaplasias conjuntivas aparecían más avanzadas / que en el animal no tratado. Con un número de animales / tan exiguo, no se pueden sacar conclusiones firmes; también hay que considerar que durante el período de tratamiento y recuperación se dejó de administrar el tóxico.- Según las investigaciones de Döbereiner comentadas más adelante, esa recuperación clínica no se produce si se // continúa administrando el duraznillo.

"Se encuentran animales en buen estado que a la necropsia se reconocen como enfermos" (Collier, 1927); una vez más creo en la necesidad de recalcar ese concepto la recuperación de peso y buen estado clínico, no es sinónimo de recuperación total. Y finalmente conviene tener presente que "aunque no se detecten casos clínicos, igualmente se están produciendo pérdidas en potreros donde existe la planta"; según manifiestan Riet Correa y col. (1975) (210).

En la Provincia de Corrientes se conocía desde hace años una afección denominada vulgarmente "Guata-í", que en guaraní significa caminar corte, de frecuente aparición en campos bajos en los que abunda el "I-byra-né", "Palo-né", "yuyo hediondo del agua" o "palo hediendo"; clasificado botánicamente como *Solanum malacoxylon* (Sendtner).

La enfermedad coincide por sus características clínicas y anatomopatológicas con el Enteque Seco (Bulman, 1970), (21)

El mismo síndrome fue diagnosticado en potreros lindantes con el río Paraguay en los que abundaba el duraznillo blanco (Carrazzoni, 1974) (30)

Gallo y colaboradores, 1973 (100) manifiestan que el *Solanum malacoxylon* crece en la cuenca del Salado, este y sudeste de la provincia de Buenos Aires, extendiéndose al sur de Entre Ríos y zonas lagunosas del Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones.

En 1970, Rauger, Iturriza y Martín comunican por primera vez el hallazgo de lesiones en las células parafoliculares de la tiroides (220). En animales espontáneamente afectados por el mal, encuentran vacuolas redondas hialinas y acidófilas en el núcleo de las células C. Manifiestan que esos cambios que podrían ser primarios o secundarios, parecen indicar una sobreactividad de las células parafoliculares, encargadas de la secreción de tirocalcitonina. Ese supuesto hipercalcitonismo indicaba / que el equilibrio metabólico de calcio y fósforo se encontraba seriamente afectado. Cabe aclarar que "los nombres de calcitonina o tiro calcitonina se han usado indistintamente. Parecería más correcto el primero, ya que las células productoras de esta hormona se pueden encontrar en el hombre no sólo en las tiroides sino también / en paratiroides y timo, y en animales vertebrados inferiores, como aves y peces, existe una glándula, la última branquial, encargada de la secreción de calcitonina". Con este párrafo trató Mautalen (165) de prevenir confusiones en sus lectores; he considerado de utilidad transcribirlo aquí con esa misma finalidad.

Como curiosidad podemos agregar que lesiones similares a las de Enteque Seco, han sido descritas en primates originarios del Norte Argentino (Malinow y Maruffo) (159,161). Los procesos de calcinosis aórtica en monos (*Alouatta caraya*) procedentes de Bella Vista, Corrientes eran según esos autores, muy similares a los que caracterizan al Enteque Seco y Naalehu Disease. Manifestando finalmente que para establecer si existe una relación con esas enfermedades, se necesitan nuevas investigaciones.

Una reseña de la enfermedad fué realizada por Rayger en 1974, con especial referencia a las lesiones macro y microscópicas características. (218)

Procesos de calcificación característicos de Enteque Seco fueron también descriptos en nuestro país afectando a ovinos, caprinos y equinos. (221)

. . . .

II- Brasil. Espichamento o Espichação

Vasconcellos comunica en 1916 el hallazgo de osificación pulmonar en un bovino faenado en San Pablo; en ese trabajo el autor habla de "Enteké" sin duda siguiendo la nomenclatura de Lignières. (251)

Aunque en Brasil la enfermedad también es causada por la ingestión repetida de *Solanum malacoxylon*, el nombre "Enteque" se aplica solamente en nuestro país (Enteque Osificante, según Collier; Enteque Seco según los demás autores); en Brasil recibe la denominación de Espichamento o Espichação (Döbereiner y otros, 1971).

En 1927, Tibiriçá estudia en detalle las lesiones aórticas en 50 bovinos de matadero; se caracterizaban por calcificaciones en la capa media, que el autor denominó procesos de arteriosclerosis. (243)

El mismo autor, también en 1927, describe procesos de calcificación y osificación en la aorta de un bovino sacrificado en avanzado estado de emaciación en el pantanal de Mato Grosso (244). Interesante es destacar / que Tibiriçá, al igual que lo hicieran Zschokke (270) y Collier (43,44), deja en claro que además de simples deposiciones cálcicas, algunas lesiones eran de osificación, es decir, verdaderos procesos de metaplasia.

Pires (1942) reporta igualmente el hallazgo de osificaciones en pulmón de bovinos faenados en San Pablo. (205)

Pardi y Santos presentan en la sesión de la Sociedad Brasileña de Medicina Veterinaria el 11 de abril de 1946, un trabajo donde comunican que el 5,24% de los bovinos faenados en el Frigorífico Anglo de Barretos (San Pablo), presentan osificación pulmonar, frecuentemente acompañada de enfisema y calcificaciones vasculares. (200)

No le dan ninguna denominación a la enfermedad, refiriéndose a la Argentina, dicen que en ese país es bien conocida una enfermedad denominada Entequé y estudiada principalmente por Ligniéres y Even. Esa misma comunicación fué publicada un año después (201). No arriesgan opinión sobre la etiología de la afección.

Barros y Santiago (7) y Barros, Pohlenz y Santiago (8) reportan un problema similar en ovinos en el estado de Río Grande del Sur. Las características son similares a las ya descritas. La enfermedad se presenta en verano-otoño, en suelos altos pobres en fósforo, calcio y sustancias orgánicas y con suficientes magnesio y potasio. La etiología no pudo ser establecida, pero señalan que el *Solanum malacoxylon* está presente en ese estado.- Como mecanismo patogénico no descartan la existencia de un proceso de calcifilaxia.

En 1971 Döbereiner, Tokarnia, Despacho da Costa, Eubank Campos y Souza Dayrell, publican una excelente revisión sobre la enfermedad conocida vulgarmente en el pantanal de Mato Grosso como Espichamento o Espichaço.(74) Y son estos autores quienes por primera vez citan a W.A. Collier, después de 45 años se rescataba del olvido el nombre de un pionero, desgraciadamente muy tarde para que sus extraordinarias conclusiones (recuérdese que fueron formuladas en 1926) pudieran ser aprovechadas; a esa publicación brasileña le corresponde en consecuencia el honor de haber colocado en el lugar relevante que indiscutiblemente le corresponde, a quién se adelantó 40 años a su época. Además de la interesante revisión histórica, Döbereiner y colaboradores presentan las observaciones realizadas en áreas en las que la enfermedad aparece espontáneamente, que según manifiestan, ocurre solamente en /

las regiones en que está presente el arbusto *Solanum malacoxylon* Sendtner. Las observaciones clínicas y anatómicas patológicas, coinciden en líneas generales con lo que ya es bien conocido en nuestro país. La parte experimental de esa publicación es comentada más adelante (Capítulo D). Concluyen que el Espichamento, al igual que el Enteque Seco de Argentina, es causado por la ingestión repetida de pequeñas cantidades de *Solanum malacoxylon*.

En 1972 Döbereiner probó los efectos de los ficocoloides quelatados en animales intoxicados con *Solanum malacoxylon*.(73) Ante mi requerimiento, el mencionado autor de Brasil, me envió una detallada descripción inédita de esas investigaciones. La experiencia se realizó con un macho cebú de 2 años de edad y 174 kilogramos de peso (al 3 de agosto de 1972), en esa fecha el animal recibió por vía intramuscular profunda 15 cc de ficocoloides quelatados (producidos en Argentina). Ese tratamiento fué repetido cada 4 semanas hasta fines de diciembre del 72. Desde el 10 de agosto al 25 de diciembre del año señalado, el animal recibió 0,16 gramos de Hojas secas de *Solanum malacoxylon* por kilogramo de peso y por semana, divididos en dos dosis "per os". El peso fué controlado quincenalmente, pudo constatarse así una constante pérdida de peso que totalizó 45 kilogramos desde el 3/8 al 22/12/72. La caquexia y pérdida de apetito llegaron a ser muy manifiestas; el animal fué hallado agonizante en decúbito lateral el 28/12/72 y sacrificado. Las lesiones macro y microscópicas observadas correspondieron a un avanzado estado de Enteque Seco. En consecuencia Döbereiner concluye en abril de 1973, que los ficocoloides quelatados no tienen efectos profilácticos o terapéuticos en la intoxicación por *Solanum malacoxylon*.

Tokarnia y Döbereiner publican un trabajo complementario del anterior, del cual podemos mencionar como dato destacable, el hallazgo de una nueva variedad de du raznillo blanco (245). Dejan establecido que tanto el So lanum malacoxyton de hojas glabras, como el de hojas pilosas (Solamum malacoxyton Sendtner variedad brachychaeta) poseen la propiedad de reproducir la enfermedad administrándolo a bovinos. Sobre esta investigación se vuelve / en el capítulo D.

Las lesiones en tejido óseo de bovinos intoxicados espontáneamente en Mato Grosso consistieron en fibrosis medular, hiperostosis endiástica y periástica, y formación de sustancia fundamental alterada (Dämmrich y col. 1975) (52).

. . . .

III) Hawaii. Enfermedad de Naalehu (Naalehu Disease)

En Hawaii se describió una enfermedad similar en 1942; Hendershot indica una carencia de fosfatos en la alimentación como posible causa. (117) Se la define como una enfermedad de los bovinos, crónica, debilitante; caracterizada por alteraciones del tejido conjuntivo de tres sistemas orgánicos: cardiovascular, respiratorio y locomotor, con aparición de arteriosclerosis, enfisema y osificación pulmonar, así como cardiopatías articulares.

Willars y col., 1965 (265) comprueban que bovinos confinados en determinados campos, adquieren la enfermedad después de un cierto tiempo; también observan que el proceso puede regresar clínicamente si los animales son trasladados a otros campos. Realizando biopsias seriadas de pulmón y carótida (resección y anastomosis), estudian la evolución de las lesiones. En animales clínicamente / recuperados, comprueban que las lesiones descritas no / regresan. Después de realizar análisis químicos de pasturas, contenido ruminal, orina y heces, dan como posible factor causal la composición química del forraje, caracterizada por contenido alto en potasio, marginal en fósforo y deficiente en magnesio; pero recalcan que los procesos patológicos que terminan en las lesiones apuntadas, permanecen sin aclarar.

Descripciones respecto a sintomatología y lesiones de la afección, fueron realizadas por Lynd y colaboradores (158) y Gebauer (104).

En 1969 Lynd presenta un estudio que abarca los / aspectos clínicos y anatomopatológicos macro y microscópicos (157). Nuevamente se inclina por considerar un desequilibrio en el contenido mineral de la ración como causa de la enfermedad. Como corroboración de sus afirmacio

nes comunica que la triada de lesiones características, se presenta en animales alimentados con una dieta muy baja en fósforo, extremadamente baja en magnesio y alta en calcio y potasio; lamentablemente, sin detallar las condiciones en que se desarrolló esa experiencia, lo que impide su confirmación.

Al igual que en otras partes del mundo con otras afecciones similares, la teoría de un desequilibrio mineral no conformó a todos. Por esa razón, al parecer, Ross y Furamoto prueban en 1970 los efectos del *Solanum sodomaeum* en codorniz y pollo (214). Remarcan la similitud de la enfermedad de Naalehu con el Enteque Seco de Argentina y se inclinan a sospechar del referido vegetal por // coincidir su distribución con las áreas de aparición del mal. Encuentran que el *Solanum sodomaeum* es altamente tóxico en esas aves, produciendo excitación nerviosa, caída de la temperatura corporal, emesis y gastroenteritis.

Al año siguiente Ross, Simpson, Rowland y Harms, realizan en pollos un estudio comparando los efectos del *Solanum sodomaeum* con *Solanum malacoxylon* proveniente de nuestro país (215). Relatan haber encontrado pérdida de peso, conversión alimenticia disminuída y fragilidad ósea con dosis altas, así como aumento de la calcemia; efectos que eran mucho más acentuados con el *Solanum malacoxylon*. Como estudios histológicos post-mortem, comunican que no observaron lesiones en hígado y riñones en // ninguno de los dos casos. En resumen: tampoco pudo demostrarse que el *Solanum sodomaeum* sea el agente causal en la enfermedad de Naalehu.

Wasserman (1975, refiriéndose a plantas calcinogénicas, informa que el arbusto *Cestrum diurnum* está presente en el sudeste de los Estados Unidos, Jamaica y tam

bién Hawaii (260). *Cestrum diurnum*, *Solanum malacoxylon* (variedades *glabra* y *pilosa*: *brachychaeta*) y *Trisetum // flavescens*, son las tres especies vegetales en que fehacientemente se ha demostrado la presencia de sustancias con efectos similares a la vitamina D o sus productos metabólicos, según se detalla más adelante,

IV) Jamaica. Enfermedad Emaciante de Manchester (Manchester Wasting Disease).

No está del todo claro desde cuando es reconocido en esa isla del Caribe el problema. La primera referencia la encontramos en 1947 (First West. Ind.Vet.Conference) en que se hace un resumen del estado sanitario en ese territorio. En lo que respecta a "Enfermedades por Carencias Minerales", se comunica el hallazgo de depósitos de calcio en endocardio y arterias de grueso calibre en vacunos de toda edad. (86)

Tres años después y bajo el nombre de Enfermedad Emaciante de Manchester, Arnold y Fincham describen una afección similar al Enteque Seco, de ocurrencia en bovinos, pero también en caprinos y "otras especies domésticas" sin especificar cuales. Describen en detalle los aspectos clínicos y las lesiones, respecto a la etiología, plantean / la posibilidad de que se trate de una carencia de magnesio y un elevado consumo de calcio. (5)

En 1954, 1956 y 1969, el mismo Arnold amplía sus observaciones. Sigue postulando un desequilibrio calcio/fósforo/magnesio como responsable por la presencia de alguna sustancia con actividad similar a la vitamina D o a la paratohormona en la alimentación. (2, 3, 4, 6)

Según se comunicó anteriormente, el arbusto Ces --

trum diurnum, vegetal que contiene una sustancia de actividad similar al 1,25 dihidroxicolecalciferol; está presente en ese país. (260)

No se ha mencionado si las zonas de distribución del *Cestrum diurnum* coinciden con aquellas de ocurrencia de la enfermedad.

V) Austria. Calcinosis de los Bovinos (Kalzinose der Rinder).

Onderscheka y colaboradores describen en 1967 un cuadro clínico en bovinos de la Baja Austria, caracterizado por adelgazamiento y bajo rendimiento lechero.- El problema, que se presenta en animales en régimen de pastoreo, tiene efectos crónicos caquetizantes resultando muy similar al Enteque Seco. Comunican el resultado de múltiples análisis de suelos, pasturas, sangre y orina de diversos animales afectados, así como diversas consideraciones ecológicas de las explotaciones involucradas. Reportan hipercalcemia y fosfatemia normal. Ya en el título de la publicación correspondiente: "Chronischer Magnesiummangel bet Kühen" (Carencia Crónica de Magnesio en vacas), queda expresada la opinión de los referidos autores en lo que a la etiología se refiere. En la discusión final, sostienen que la hipomagnesemia aguda conduce a la tetania, mientras que la forma crónica produce caquexia, calcificaciones en tejidos blandos, baja de la temperatura corporal, defectos de la piel y disminución del contenido sérico en magnesio. (183)

En 1969, Libiseller y Gunhold describen en varias regiones de Austria una afección caracterizada por trast

tornos locomotores, apoyo en las articulaciones carpales cifosis, piel inelástica y con evolución hacia un cuadro de caquexia. (150) La enfermedad hace su aparición en verano-otoño y en animales a pastoreo. Pulmones y arterias mostraron calcificaciones, encontrándose igualmente alteraciones en huesos y articulaciones. Para esta enfermedad adoptaron en principio la denominación de "Weidekrankheit", que podríamos traducir como Enfermedad de los Pastizales; los mismos autores abandonarían con posterioridad ese nombre, al constatar el mal igualmente en animales estabulados. La "Weidetetanie" (tetania hipomagnésica, mal de los avenales) es conocida también como Weidekrankheit en algunas regiones de habla alemana; fue por consiguiente, un cambio de denominación afortunado.

Köhler y Libiseller publican en 1970 un estudio de 48 páginas con 216 citas bibliográficas, donde describen en forma muy completa sintomatología, lesiones macro y microscópicas, análisis químicos en huesos, arterias, pulmones, suero sanguíneo y orina; sin olvidar tampoco sus estudios cauli y cuantitativos de los distintos componentes de las pasturas, y consideraciones sobre las características de los suelos y abonos en ellos usados. En la discusión sobre la etiopatogenia de la enfermedad, comunican que el producto calcio-fósforo en suero sanguíneo suele aparecer aumentado y que en los estudios realizados no han conseguido apreciar deficiencias de oligoelementos, responsabilizando por los trastornos descritos a sustancias orgánicas contenidas en las plantas forrajeras de naturaleza desconocida hasta este momento.

(130)

En 1974 Köhler y colaboradores (131) publican sus estudios sobre el metabolismo del fósforo en vacas afectadas.

tadas repetidamente de Calcinosis. Ya con anterioridad, (1972,1973), Dirksen y colaboradores en el vecino estado de Baviera (República Federal de Alemania), habían demostrado la responsabilidad de una o más sustancias orgánicas presentes en el *Trisetum flavescens* como causa de la Calcinosis Enzoótica de los bovinos (65,66).

Los referidos autores austríacos afirman que ya en 1927 Collier demostró que los animales afectados por la ingestión de *Solanum glaucum* (sinónimo: *S. malacoxylon*) "mejoran clínicamente al cambiarlos de campo, pero sin regresión de los procesos de calcificación". Ellos por su parte encuentran lesiones características 4 años después de cambiar el régimen alimenticio de los animales afectados. Como la enfermedad se presentó también en invierno, y en animales que no habían estado en pastizales tóxicos, sugieren la conveniencia de abandonar la denominación de "Weidekrankheit" (Enfermedad de los Pastizales), designando a la afección como "Calcinosis".

Al contrario de lo que ocurre con el *Solanum malacoxylon*, *Trisetum flavescens* posee buena palatabilidad y ha sido considerada como muy buena forrajera, razón por la cual integra en diversas regiones y en proporciones variables, las reservas de alimentos que los productores destinan a la larga estabulación invernal. Así se explica la aparición de Calcinosis aún en épocas en que la nieve hace imposible un régimen de pastoreo.

Libiseller y colaboradores (151), reproducen experimentalmente la enfermedad en ovejas alimentadas con gramíneas provenientes de las zonas problema; y un cuadro nosológico equivalente en conejos alimentados durante 16 semanas con *Trisetum flavescens*. No consiguen resultados

positivos administrando el vegetal proveniente de otra región (zona climática Panonia); concluyen que abono, terreno y clima puede ejercer influencias sobre las sustancias contenidas en la planta, sugiriendo nuevas investigaciones al respecto.

En una conferencia realizada en Gumpenstein (junio de 1974), Libiseller recalca la similitud de la Calcinosiis de Austria con la Hipervitaminosis D y el Enteque Seco de Sud América, causado por la ingestión de la solanacea *Solanum malacoxylon* (149).

En 1976, Libiseller, Glawischnih, Köhler y Swoboda, demostraron el efecto calcinogénico del *Trisetum flavescens* proveniente de la región extraalpina Panonia en ovejás y conejos, resultados que no habían conseguido dos años antes. El *Trisetum flavescens* utilizado había sido cultivado en dos tipos distintos de terreno abonados en forma intensiva, en la mencionada zona (152).

Los conocimientos actuales sobre la calcinosis centroeuropea fueron reseñados por Köhler (1977) (129). De interés resulta la cita que hace de Peterlik (202); según ese autor la avena dorada no contiene $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la sustancia activa por lo tanto no sería la misma que en el *Solanum malacoxylon*, a pesar que las afecciones que ambas provocan son prácticamente iguales. Sus experiencias se basan en las investigaciones de Wasserman (1974) (Ver Capítulo D); una dieta alta en estroncio activo inhibe la conversión de 25-OH-D_3 a nivel renal (Ver capítulo C), ese efecto inhibitorio del estroncio puede ser anulado suministrando $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sintético o *Solanum malacoxylon*. Igual acción ha mostrado el *Cestrum diurnum* (ver capítulo B: XI-EEUU) *Trisetum flavescens*, por el contrario, según

las conclusiones de Peterlik, es incapaz de revertir ese bloqueo.

-oOo-

VI) República Federal de Alemania. Calcinosis Enzoótica de los Bovinos. (enzootische Kalzinose beim Rind).

Dirksen comunica en 1969 el hallazgo en el sur de Alemania de una afección a la que él mismo denominó Calcinosis Enzoótica de los Bovinos (58). Describe sus características clínicas y anátomopatológicas, y descarta terminantemente una carencia de magnesio como etiología; recuérdese que a ese origen había atribuido Onderscheka en Austria (1967) una enfermedad similar.

De allí en más comienza una larga serie de investigaciones con la participación de profesionales de diferentes centros de Alemania Occidental.

A mediados de 1970 Dirksen, Plank, Spiess, Hüni chen y Dämmrich, publican los primeros resultados de esa serie (59). En la introducción señalan que la afección viene siendo observada desde hace 5-6 años en la región prealpina de Baviera. Interesante resulta la revisión somera que realizan de lo publicado sobre problemas similares, y en especial respecto a las etiologías propuestas. Después de mencionar las hipótesis formuladas en Hawaii, Jamaica y Austria, y en referencia al Enteque Seco, expresan que el grupo de especialistas del proyecto FAO/INTA demostró que esa calcinosi es provocada por la ingestión repetida de *Solanum malacoxylon*, manifestando que la etiología de las otras calcinosi permanece sin aclarar.

Detallan las características de las explotaciones afectadas en lo referente a situación geográfica, clima, suelos, composición de pasturas, etc.; así como manifestaciones clínicas, evolución y lesiones de los animales afectados. De los análisis realizados de piensos y hue

sos; y por distintos ensayos terapéuticos de resultado negativo, concluyen que una hipomagnesemia crónica es prácticamente imposible. La fosfatemia la encuentran significativamente aumentada, el calcio sérico se mantenía alto aunque raramente pasa el límite fisiológico superior, mientras que la magnesemia se encuadraba dentro de valores normales. Se inclinan a considerar el problema como de origen alimenticio, relacionado en especial con los vegetales frescos.

Hänichen, Plank y Dirksen publican los estudios histológicos en tejidos blandos (111). Remarcan la total similitud de las lesiones encontradas, con las descritas por Eckell, Gallo, Martín y Portella (83); y Gaggino (90) en el Enjereque Seco.

También en 1970, Dämmrich, Dirksen y Plank informan lesiones de osteomieloesclerosis detectadas por técnicas histológicas y microradiográficas (51).

Una reseña de las investigaciones anteriores fue publicada en alemán, inglés, español y francés en 1971. (61, 62, 63, 64).

Con la finalidad de detectar al vegetal responsable de la afección, se procedió a alimentar ovejas con trebol, gramíneas o una mezcla de pastos diversos. (Dirksen y colaboradores, 1971). (60). Después de aproximadamente 10 semanas, solamente mostraron lesiones arteriales de calcificación los animales que recibieron gramíneas. Resultaban sospechosas hasta ese momento, *Dactylis glomerata* y *Trisetum flavescens*.

En febrero de 1972 (Dirksen, Plank, Hänichen y Spiess) se comunica que alimentando a 3 grupos de conejos con *Dactylis glomerata*, *Trisetum flavescens* y una mezcla

de gramíneas; vegetales todos provenientes de una zona en que se presenta la enfermedad (Allgäu); solamente *Trisetum flavescens* muestra la capacidad de producir calcificaciones arteriales (65).

En consecuencia, hasta 1972 se había demostrado que: 1. La calcinosis es producida por la alimentación verde. 2. El factor calcinogénico está en las gramíneas.- 3. De las dos gramíneas más distribuidas (*Dactylis glomerata* y *Trisetum flavescens*), sólo la última muestra efectos calcinogénicos en el conejo.

Continúan las investigaciones en esa dirección, con el objeto de asegurar los resultados obtenidos y de considerar posibles influencias de otros factores.

Así es que en 1973 (66) aparece el sexto trabajo de la serie "Sobre una Calcinosis Enzoótica de los Bovinos", iniciada en 1970. Ese trabajo experimental fué desarrollado en cinco lotes de conejos; el primer grupo recibió avena dorada (*Trisetum flavescens*) recogida en las áreas problema; el lote 2 fué alimentado también con *Trisetum flavescens* proveniente de una explotación en que aparece la enfermedad, pero especialmente obtenido en monocultivo y en terreno fertilizado en forma intensiva; el tercer lote es mantenido con el mismo vegetal pero obtenido en monocultivo en una parcela no fertilizada; grupo 4, una mezcla de vegetales frescos; y 5, pellets y heno, como lote testigo. Todos los animales de los grupos 1 y 2 mostraron lesiones de calcificación clasificadas como de intensidad media o elevada no sólo en el sistema circulatorio, sino también en pulmón, riñón y tendones flexores. Lesiones de poca intensidad encuentran en el arco aórtico de un animal del grupo 3 y otro del grupo 4, así como en

2 animales testigos.

Nuevas investigaciones se realizaron en 1973 y publicaron al año siguiente (69,113), con el objeto de comprobar en ovejas los resultados obtenidos en conejos y al mismo tiempo averiguar si el *Trisetum flavescens* tenía efectos tóxicos cultivado fuera de la región prealpina. Las ovejas mantenidas en una explotación que resultaba afectada, desarrollaron lesiones tanto en cultivos de avena dorada como en pasturas naturales con un 20 a 25% de ese vegetal; las que se alimentaron de una pastura en que no existe el *Trisetum flavescens*, por el contrario, no mostraron lesiones. La segunda parte de ese trabajo se desarrolló en la zona de Giessen a varios cientos de kilómetros de distancia, en campos llanos y en los que no se presenta espontáneamente la enfermedad; las ovejas mantenidas en monocultivos de *Trisetum flavescens* desarrollaron lesiones, no así las que permanecieron en cultivos de *Dactylis glomerata* o pasturas naturales. La conclusión final de los mencionados autores, es que la vulgarmente llamada avena dorada (Goldhafer), cuyo nombre científico es *Trisetum flavescens*, causa la calcinosis enzoótica de los binos, señalando además que el principio activo muestra efectos biológicos similares a la vitamina D.

En el número 8 de la serie "Sobre una Calcinosi Enzoótica de los Bovinos", Dirksen, Plank, Hänichen, Daniel y Spiess (1974) tratan de determinar la posible influencia de la radiación solar en la génesis de esa afección, y además comprobar los efectos del *Trisetum flavescens* desecada (70). Ovejas que recibieron el vegetal "ad libitum" y fueron mantenidas en estable, no mostraron diferencias en las lesiones producidas con los animales que,

con igual alimentación, permanecieron a cielo abierto. Concluyen que los efectos de la avena dorada son independientes de la radiación solar y que no resultan aumentados por la misma. En una segunda parte comprueban que el vegetal, seco, conserva sus efectos tóxicos, aunque al parecer disminuídos.

También en 1974 son publicados en inglés (Dirksen, Plank, Hänichen y Simon) los hallazgos obtenidos hasta ese momento; y nuevamente remarcan la similitud de la Calcinosis Enzoótica con el Enteque Seco y la Hipervitaminosis D. (68).

Dirksen y Plank (1975) publican un trabajo de divulgación destinado a permitir a los productores el reconocimiento de la enfermedad y de su agente causal (71). Su mamente interesantes resultan los consejos prácticos para evitar o mitigar el mal; en lo posible reducir la planta en cantidad, no incluirla en los potreros que sean resembrados; si la densidad de *Trisetum flavescens* es respetable, no destinar esos cuadros a pastoreo directo y utilizarlos para henificar, ya que al parecer el vegetal seco es menos tóxico.

Un interesante trabajo de tesis es presentado por Spiess en la Universidad Justus Liebig en Giessen: "Nuevas observaciones sobre la naturaleza y evolución de la Calcinosis Enzoótica de los Bovinos" (*Weitere Beobachtungen über Wesen und Verlauf der enzootischen Kalzinose des Rindes*, 1974) (239). De la reseña general que realiza, podemos mencionar que es esa la primera vez en que se consideran en detalle las investigaciones de Collier respecto al Enteque Osificante en Argentina. La enfermedad había sido comprobada con certeza hasta ese momento, en 15 esta—

blecimientos de la región prealpina. Ensayó la terapéutica con ficocoloide quelatados provenientes de nuestro país, y encuentra que fueron ineficaces para normalizar los niveles séricos de fósforo y calcio; a pesar de que los animales mostraron una recuperación aparente. Manifiesta también que los ficocoloides fueron ineficaces en la prevención de la "calcinosis sudamericana", según experiencias realizadas por D^oberreiner en Brasil (Comunicación personal de D^oberreiner a Spiess en 1973). La administración de distintos compuestos de magnesio, sulfato de cobre o cortisona de acción prolongada, no arrojaron tampoco resultados positivos.

Simon, Daniel y Dirksen publican en 1975 otro trabajo de relevancia (233); el título ya es por demás significativo: "Avena dorada: forrajera de gran valor o planta tóxica?" (Der Goldhafer (*Trisetum flavescens*(L)P. B.), hochwertiges Futtergras oder Schadpflanze?). A pesar de todas las investigaciones anteriores, esa pregunta necesitaba una detenida consideración. Klapp (132) y Stählin (240) consideraban que era la forrajera de más valor en la zona montañosa; Mott (173) había aconsejado su inclusión en las pasturas. En más del 90% de las pruebas de henos realizadas en el sur de Alemania (19,232) estaba presente la avena dorada; quedaba sin resolver la incógnita de por qué entonces la afección se limita a unas pocas zonas. Podría pensarse en una concentración de la sustancia activa en el vegetal, o en una directa influencia del porcentaje de *Trisetum flavescens* en la alimentación, sin dejar de considerar tampoco la magnitud del período durante el cual los animales lo consumen. Para tratar de esclarecer en parte esos interrogantes, suministran ave-

La dorada a ovinos en distintas proporciones, 1:7, 1:3, y 1:1. Encuentran que todos los animales pierden peso, pero que esa caída es mayor cuanto más alta es la proporción de *Trisetum*. La avena dorada muestra en esa oportunidad los mismos efectos ya provenga de terrenos abonados con alta o baja densidad de compuestos nitrogenados. Concluyen fuera de toda duda, que *Trisetum flavescens* es una planta perjudicial por ser portadora de una sustancia de efectos calcinogénicos.

En el número 9 de la serie anteriormente mencionada, nuevamente se considera la posible influencia de los fertilizantes sobre la aparición de la enfermedad (Plank, Hänichen y Dirksen) (206). Comunican los resultados de las investigaciones llevadas a cabo durante tres años, agregando distintos fertilizantes y en proporciones variables a los suelos. Dejan en claro que los fertilizantes no ejercen ningún efecto directo sobre el principio tóxico; no se descarta sin embargo, que puedan influir sobre la proporción de *Trisetum flavescens* integrante de las pasturas.

En opinión del profesor Gerrit Dirksen (Comunicación personal, octubre de 1976), la Toxicidad del *Trisetum flavescens* manifiesta variaciones cuantitativas según: la mayor o menor cantidad de sustancia verde (no significada) que contiene, el porcentaje en que integra las pasturas, y la duración del período de crecimiento. Cualitativamente, todas las muestras de la mencionada gramínea han mostrado actividad calcinogénica.

Wolf y Dirksen (1976) publican nuevos estudios realizados en conejos para observar los efectos ejercidos por la avena dorada sobre los niveles de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina en suero sanguíneo (267). Tanto fresco,

secado al sol, liofilizado o secado artificialmente, el vegetal ocasionó un aumento de la fosfatemia y caída de actividad de la fosfatasa alcalina. Los niveles de calcio resultaron afectados con regularidad y en gran medida. Concluyen que la determinación de fósforo inorgánico en suero sanguíneo, es un método apropiado para revelar actividad calcinogénica de vegetales en el conejo.

En noviembre de 1976, salió de imprenta en Munich la tesis de Manfred Wolf; en ella, realiza una amplia consideración sobre el conejo en relación a las investigaciones experimentales sobre calcinosis (266). Comenzando por las experiencias de resultado negativo que efectuara Collier en nuestro país (1927), llega hasta 1976. El metabolismo mineral normal, y la hipervitaminosis D en el conejo, reciben así mismo una prolija descripción. Por los resultados bioquímicos y anatómopatológicos concluye que el conejo es un animal apropiado para ese tipo de investigaciones. Además comprueba que los efectos del *Trisetum flavescens* no resultan modificados por las radiaciones ultravioletas artificiales.

VII) Israel. Calcinosis en Cabras. (Calcinosis in Goats)

Arnold (2) refiriéndose a la Enfermedad Emacian-
te de Manchester, dice que en Palestina ocurre una afec-
ción similar, desafortunadamente sin indicar el origen de
esa información.

Neumann, Nobel y Klopper (1973) comunican el ha-
llazgo de calcinosis en cabras (175). Señalan que es esa
la primera descripción que se hace en Asia, excluyendo la
afirmación de Arnold en 1954 debido a que ese autor, mani-
fiestan Neumann y colaboradores: "no presentó detalles".-
Hallan lesiones macro y microscópicas idénticas a las des-
criptas por Barros, Pohlens y Santiago (8) en ovinos de
Río Grande del Sur, Brasil. Los animales estudiados en Is-
rael, comían ocasionalmente *Solanum mammosum*; administra-
do a cabras el referido vegetal, en un intento de reprodu-
cir experimentalmente la enfermedad, obtienen un resulta-
do negativo.

En resumen; remarcan que las lesiones encontra-
das son semejantes a las señaladas en otros países y en
diferentes especies. Respecto a la causa, manifiestan que
por el momento es inexplicable.

-oOo-

VIII) Sud Africa. Calcinosis Enzootica de los Ovinos. (En-
zootic Calcinosis of Sheep).

Tustin y colaboradores comunican en 1973, la pre

sentación de una afección para la que proponen la denominación de Calcinosi*s* Enzootica Ovína (248). La afección era observada en el Estado Libre de Orange desde el verano de 1966/67; encontrándola muy semejante a lo ya publicado en Sud América, Hawaii, Jamaica, Alemania y Austria, tanto clínica como patológicamente. La etiología no pudo ser determinada; se inclinan por considerar una carencia de magnesio en la alimentación, pero sin descartar la posible existencia de algún vegetal con efectos similares al *Solanum malacoxylon* o *Trisetum flavescens*.

-oOo-

IX) India. Calcinosi*s* Enzootica en Ovínos. (Enzootic Calcinosi*s* in Shepp).

Distintos autores señalan una calcinosi*s* en ovínos similar a las descritas en otras partes del mundo. Kwatra, Hothi, Singh y Chawla la informan al parecer por primera vez en 1974 (139).

En 1976, Gill, Singh, Malkiat y Chopra, describen las características clínicas y anatomopatológicas. (105)

Singh, Gill y Randhawa (235) publican los resultados de un año de trabajo empleado en determinar la composición física y química de suelos y alimentación correspondientes a las áreas afectadas, así como diversas determinaciones en el agua de bebida y en líquido ruminal de los animales enfermos. Encuentran que el agua tiene un contenido mineral elevado; y las pasturas presentan bajo nivel de

potasio, nitrógeno, fósforo y alto contenido de calcio.— Por los desequilibrios entre calcio, fósforo, potasio y magnesio revelados en el forraje, deducen que puede contribuir a provocar las lesiones descritas; en la última frase del trabajo declaran que no puede excluirse ciertamente, la presencia de una planta tóxica con efectos calcinogénicos aun no identificada.

-oOo-

X) Nueva Guinea. Calcinosis Enzoótica en Bovinos. (Enzootic Calcinosis of Cattle).

Copland comunica en junio de 1975 el hallazgo de la enfermedad en bovinos del territorio de Papua, Nueva Guinea (47). Le da la denominación de Calcinosis Enzoótica, al igual que hiciera Dirksen en Alemania. Destaca la similitud del mal con el Enteque Seco de Argentina, la Calcinosis Enzoótica de Baviera y la Enfermedad de Naalehu de Hawaii. Solamente se presenta en una determinada zona del territorio, en el valle de Bulolo. La calcemia y fosfatemia resultan aumentadas en los animales severamente afectados. Después de señalar que en esa isla no se encuentra *Solanum malacoxylon* y tampoco *Trisetum flavescens*, sugiere la existencia de otra planta con los mencionados efectos.

-oOo-

XI) Estados Unidos. Intoxicación por *Cestrum diurnum*.

Cestrum diurnum Poisoning).

Greech (1941) (109) comunica el hallazgo de calcificaciones arteriales y pulmonares en bovinos; Gailiunas (1958) (94), las observa a su vez en aortas de la misma especie animal. Pero recién en 1975 comienza a considerarse al problema como entidad nosológica definida, después que Krook, Wasserman, Shively, Tashjian, Brokken y Morton, describieran con precisión la enfermedad en equinos del estado de Florida (135). Se caracteriza por calcinosis en distintos órganos, emaciación, osteopetrosis e hipercalcemia. La etiología se atribuyó a un arbusto vulgarmente conocido como "jazmín silvestre", "niño del día" o "jazmín del día floreciente"; cuyo nombre botánico es *Cestrum diurnum* y que está dentro de la familia de las solanáceas.

Wasserman, Corradino y Krook (263) publican una investigación en la que demuestran que el principio activo del *Cestrum diurnum* posee efectos biológicos similares al 1,25 dihidroxicolecalciferol y al *Solanum malacoxylon*. Para ello comprueba, al igual que ya lo hicieran anteriormente con *Solanum malacoxylon* (Ver capítulo D, Wasserman 1974), la capacidad del *Cestrum diurnum* de aumentar la absorción intestinal de calcio en pollos. El mencionado vegetal, según informan, equivale aproximadamente a la actividad de 30.000 U.I. de vitamina D₃ por Kilógramo. Para el *Solanum malacoxylon*, Wasserman, Bar, Corradino, Taylor y Peterlik (262), encuentran que ese equivalente oscila en el orden de 300.000 U.I./Kg. Es interesante la observación de que el principio activo del *Cestrum diurnum* es soluble

en metanol: cloroformo (2:1), mientras que el compuesto biológicamente equivalente del *Solanum malacoxylon* no lo es. Lo anterior parecería indicar que los principios activos no son iguales, o que se presenten conjugados con sustancias de distinta composición química.

La enfermedad es descripta también en bovinos (Krook, Wasserman, McEntee, Brokken y Teigland, 1936); las lesiones coinciden con lo que ya es bien conocido en nuestro país, resultan novedosas y quizás de relevancia futura algunas alteraciones que consideraremos a continuación. A nivel esquelético comunican el hallazgo de procesos de osteopetrosis y osteonecrosis. Basándose en las observaciones microscópicas de la tiroides, las que mostraron una evidente hiperplasia de las células C; concluyen que el hipercalcitonismo puede provocar el proceso de osteopetrosis, pero no ha mostrado la capacidad de ocasionar osteonecrosis. Postulan como razonable, la hipótesis de que el *Cestrum diurnum* por sí mismo sea el responsable directo de esa alteración. Igualmente significativos resultan los hallazgos microscópicos en las glándulas adrenales; la zona glomerular se presenta con un espesor aproximadamente 4 veces mayor que en animales normales, las células pararenquimatosas de la misma, mostraban numerosos cuerpos eosinófilos pequeños. En las zonas fascicular y reticular encuentran grandes acúmulos linfocitarios. La hiperplasia de la zona glomerular de la corteza adrenal, sugiere un aumento en la secreción de renina por las células yuxtaglomerulares, al decir de los referidos autores. Pero en riñón sólo encuentran una moderada nefroesclerosis que afecta a la cápsula de Bowman de los glomérulos y al tejido intersticial. Las células yuxtaglomerulares, observadas con

versas técnicas de coloración, no mostraron alteraciones. En cuanto a los acúmulos linfocitarios en la corteza adrenal, señalan que son frecuentes en bovinos con enfermedades debilitantes crónicas.

Wasserman y colaboradores (264), confirman y amplían considerablemente los hallazgos anteriores con referencia a los efectos biológicos del *Cestrum diurnum*.

En pollos mantenidos con dieta raquitógena, ese vegetal produce un incremento en la síntesis de la proteína de conjugación del calcio (calcium binding protein, C_{aBP} ; ver capítulo C) a nivel intestinal, y en consecuencia un aumento en la absorción de calcio. Confirman que una alimentación rica en estroncio estable (inhibidor de la 25-hidroxicolecalciferol-1 alfa-hidroxiasa a nivel renal; ver capítulo C, II-Metabolismo de la vitamina D), es incapaz de bloquear los efectos del *Cestrum diurnum* en duodeno. Lo mismo se había logrado anteriormente con *Solanum malacoxylon* (capítulo D: Wasserman 1974). Quedaba así confirmada la presencia en ese vegetal, de un compuesto de actividad biológica similar al 1 alfa, $25(OH)_2D_3$, forma hormonal activa de la vitamina D_3 .

-oOo-

XII) Uruguay. Calcificación metastásica enzoótica en bovinos. (Enteque seco).

Osificaciones aórticas en bovinos del vecino país fueron observadas en 1919 (223) y 1964 (12).

La afección es descripta en 1975 (Riet Correa, Riet Correa y Bellagamba) (210). Se estudiaron las características clínicas y anatómopatológicas de animales afectados, y se consiguió la reproducción experimental de la enfermedad por administración de *Solanum malacoxylon*.

En potreros con gran densidad de duraznillo blanco observaron una incidencia de hasta 80%, mientras que no se presentaron animales clínicamente enfermos en terrenos donde el vegetal aparece en pequeños grupos aislados.

Un manejo poco adecuado de los potreros puede favorecer la aparición del mal. Los autores mencionados, refieren que en determinadas zonas es práctica común quemar al comienzo de primavera "para combatir el cardo de los bañados o "caraguatá" (*Eringium eburneum*), quemando conjuntamente el Duraznillo blanco, el que rebrota en forma exuberante mezclado con las pasturas, lo que favorece su ingestión. En potreros donde la distribución de Duraznillo blanco era la misma y no se usaba la práctica de quemar, la incidencia era menor".

El problema ha sido detectado en bovinos en los departamentos de Canelones, Rocha y Colonia (Riet Correa y col.); y en bovinos y ovinos de Tacuarembó (Echavarren, año 1975)(84). Según esa publicación uruguaya, la enfermedad también aparece en Bolivia (169).

Concluyen manifestando que: "Su incidencia económica es de indudable importancia. Se previene sobre la posibilidad de que aparezca en otras zonas del país, debiéndose tener en cuenta que, aunque no se detecten casos clínicos, igualmente se están produciendo pérdidas en potreros donde existe la planta"; concepto este último de indudable trascendencia, y que suele no ser considerado.

C. METABOLISMO Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA VITAMINA D.

I) Generalidades.

Los últimos y asombrosos conocimientos logrados respecto al *Solanum malacoxylon* y consecuentemente a la patología del Enteque Seco, se basan fundamentalmente en una mejor comprensión del metabolismo del calcio. Al mismo tiempo, las propiedades biológicas de la referida solanácea, han llamado la atención y están siendo aprovechadas por quienes tratan de esclarecer en su totalidad el metabolismo y significación biológica de la vitamina D. Veamos sumariamente en que punto se encuentran esos conocimientos.

Ergocalciferol (vitamina D_2 , $C_{27}H_{44}O$), colecalciferol (vitamina D_3 , $C_{28}H_{44}O$) y sus metabolitos, son los compuestos fisiológicamente importantes del grupo. La vitamina D_2 se origina a partir de la ergosterina (provitamina) presente en hongos y levaduras por irradiación ultravioleta. El aceite de hígado de pescado y diversos tejidos adiposos, son ricos en vitamina D_3 ; también se forma en organismos animales por acción de los rayos ultravioletas sobre el 7-dehidrocolesterol. Esa activación de la provitamina se cumple en la piel por efecto de la luz solar. Las propiedades antirraquíticas de las vitaminas D_2 y D_3 son aproximadamente equivalentes. Para la absorción de estas sustancias liposolubles, es necesaria una normal absorción lipídica.

La importancia fisiológica de la vitamina D no está aún totalmente aclarada. Promueve la absorción intestinal de calcio y fósforo, y la movilización de sales a partir del tejido óseo, especialmente por efecto de su muy activo metabolito 1,25 dihidroxicolecalciferol; también lla-

mado 1,25 dihidroxivitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), y ultimamente hormona D.

II. Metabolismo.

El colecalciferol de cualquier origen, es transportado al hígado y allí hidroxilado en posición 25; dando lugar así al 25-hidroxicolecalciferol ($25-OH-D_3$), primer metabolito de la vitamina D aislado e identificado en 1968.

Durante las investigaciones realizadas para aislar a la referida sustancia, quedaron de manifiesto otros compuestos con mayor polaridad aún que el $25-OH-D_3$. Una de esas sustancias encontrada en cantidades significativas en intestino, fué identificada como 1,25 dihidroxicolecalciferol. Posteriormente se comprobó que la transformación de $25-OH-D_3$ a $1,25(OH)_2D_3$ se realiza únicamente en el riñón. Mitocondrias de riñón de pollo aisladas, fueron capaces de realizar esa transformación, siempre que contaran con malato como sustrato principal, oxígeno molecular y piridina nucleótidos reducidos; esa reacción está catalizada por la 25-hidroxicolecalciferol-1-hidroxilasa. Gran número de experiencias permiten asegurar que el riñón es el órgano responsable de esa hidroxilación y que el $1,25(OH)_2D_3$, llamada por algunos autores hormona D; podía ser considerado allí en mas, una hormona esteroidea.

La síntesis de $1,25(OH)_2D_3$ está en relación a la concentración de calcio circulante. Se ha comprobado que animales sometidos a una alimentación pobre en calcio, sintetizan grandes cantidades de $1,25(OH)_2D_3$; por el contrario, si la alimentación es muy rica en calcio, la síntesis

sis de la referida hormona disminuye. En este último caso y como mecanismo de compensación se produce otro metabolito: 24,25 dihidroxivitamina D_3 ($24,25(OH)_2D_3$), cuya significación biológica aún no ha sido aclarada.

La síntesis de $1,25(OH)_2D_3$ resulta igualmente regulada por la paratohormona. Ratas paratiroidectomizadas pierden la capacidad de sintetizar $1,25(OH)_2D_3$, produciendo en su lugar $24,25(OH)_2D_3$. Tras la administración de hormona paratiroidea, comienza nuevamente la síntesis de $1,25(OH)_2D_3$; en consecuencia la paratohormona ha sido considerada una hormona trófica para la síntesis de $1,25(OH)_2D_3$.

Fosfatemia, calcitonina y quizás otros factores ejercen igualmente influencias sobre este sistema hormonal, cuya exacta regulación aún no se conoce.

Ocasionalmente ha sido estudiado también el metabolismo de la vitamina D_2 ; $25-OH-D_2$ y $24,25(OH)_2D_2$, han sido aislados e identificados. Igualmente se ha conseguido la síntesis de $1,25(OH)_2D_2$ "in vitro", mediante mitocondrias de riñón de pollo. En consecuencia, el metabolismo del ergocalciferol, puede ser considerado como muy similar al del colecalciferol.

III) Efectos biológicos y mecanismo de acción del $1,25(OH)_2D_3$.

a) En el intestino: es bien conocido que el referido esteroide estimula la absorción del calcio e independientemente del fósforo. El mecanismo molecular no está aclarado, se han realizado no obstante grandes avances en esa dirección. Ha sido aislada e identificada una proteína dependiente directa e indirectamente de $1,25(OH)_2D_3$, denomi-

nada proteína de conjugación del calcio (Calcium Binding Protein, CaPB); la capacidad de captación de calcio por la mucosa entérica aparece en relación directa con la concentración de esa sustancia. Hay indicios para suponer que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce sus efectos sobre receptores cromáticos, eso desencadenaría la síntesis de un ARN mensajero determinado y de CaPB. Trabajando con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ radioactivo, se comprobó su localización en la fracción nuclear de las células intestinales; por otra parte, la actinomicina D ha sido capaz de inhibir la síntesis de CaPB, pero sin impedir la unión $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -receptor.

El $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la transferencia de fosfatos inorgánicos a través de las paredes de ileon y yeyuno, en un proceso independiente del transporte de calcio. No se ha encontrado una proteína de conjugación del fósforo.

b) En el tejido óseo: hay coincidencia en afirmar que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promueve la movilización de calcio y fósforo; el mecanismo de acción es igualmente desconocido. Este proceso necesita "in vivo" la presencia de hormona paratiroidea, mientras que en cultivos de tejido óseo se produce aún sin adición de esa hormona.

c) En otros tejidos: en riñón favorece la reabsorción de calcio, aunque cuantitativamente esta función no parece tener una gran importancia fisiológica. La CaPB fué también aislada de tejido renal, resultando incrementada por efecto de la vitamina D.

La vitamina D y/o sus metabolitos, estimulan la contracción muscular.

Publicaciones sobre vitamina D consultadas: De

Luca H.F., 1974(55); Wasserman R.H. y Taylor, 1974(261); Norman A.W., 1974(177); Norman A.W. y Henry H., 1974(178); Haas H.G., 1976(110); DeLuca H.F. y Schnoes H.K., 1976(56).

-000-

- D. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON DURAZNILLO BLANCO. (*Solanum glaucophyllum*, *Solanum malacoxylon* o *Solanum glaucum*).

Revisión bibliográfica.

En lo que respecta a la denominación del vulgarmente llamado duraznillo blanco, suelen producirse algunas confusiones, originadas en el hecho de que esa planta fué identificada en tres oportunidades por distintos autores. En 1829, se la describe e identifica como *Solanum glaucophyllum* Desf.; la segunda identificación fué realizada en 1846, recibiendo entonces la denominación de *Solanum malacoxylon* Sendtner; y finalmente, otra clasificación bajo el nombre de *Solanum glaucum* Dunal fué realizada en 1852. El correcto nombre botánico sería en consecuencia, *Solanum glaucophyllum* (D'Arcy, 53; Walling y otros, 257; Peterlick y otros, 204; Boland y otros, 15), aunque por costumbre, la mayoría de los autores sigue adoptando la denominación de *Solanum malacoxylon*.

La posible relación entre el duraznillo blanco y el Enteque Seco, fué planteada por primera vez en 1926. W.A. Collier escribe y publica (43,44) sus observaciones sobre la enfermedad espontánea, así como sus conclusiones sobre los efectos biológicos del *Solanum glaucum* en varias experiencias realizadas. Según esos primeros resultados, descartó un efecto tóxico para conejos y cobayos; las palomas morían tras la inyección de 4 g de extracto de hojas, pero ese efecto tóxico agudo lo consideró de poco interés. Trabajando en ovejas comprueba que tras la administración del extracto correspondiente a 200 g de hojas por vía oral, se produce una marcada caída de la calcemia; cuya determinación fué efectuada cada hora y hasta 6 horas post-administración. Por qué razón no continuó esas determinaciones por un período mayor, se desprende con facilidad de las conclusiones del autor en el referido trabajo, al decir que lo más importante era comprobar si el duraznillo blanco ejercía algún efecto sobre el metabolismo del calcio. Para las determinaciones del calcio utilizó el método de Waard (254) y según las modificaciones de Kramer y Tisdall (134); cada muestra fué analizada dos veces y pruebas de control realizó el Dr. Torini en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene. En otra experiencia similar obtiene una caída de la calcemia mayor; esa diferencia podría deberse según Collier, a que en ese caso se trataba de hojas frescas. Concluimos que el *Solanum glaucum* baja la calcemia, posiblemente por efectos ejercidos sobre el sistema endócrino y resta importancia a sus efectos tóxicos agudos.

En 1942, Eckell estudia también esos efectos en varias especies. Describe inflamaciones y hemorragias gas

trointestinales, congestión renal y pulmonar. Concluye que se requieren grandes cantidades de *Solanum glaucum* para producir intoxicación aguda y muerte; aún cuando comprueba un efecto tóxico, le resta importancia práctica debido a la baja palatabilidad del vegetal (81,82).

En el VII^o Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica (Buenos Aires 26/11-4/12/1966) Garcés y colaboradores (103) presentan sus conclusiones en relación a los efectos del *Solanum malacoxylon* sobre calcio y fósforo inorgánicos en sangre de bovinos. Previamente se había comprobado la capacidad de las pasturas provenientes de las áreas entecadoras, de incrementar los niveles de calcio y fósforo inorgánicos en sangre, al ser administradas vía fístula ruminal (Landó y colaboradores, 143). Consideran como valor límite normal, al producto calcio por fósforo (ca. x P.) igual a 60 (Kennedy, 127). Administrando las cenizas correspondientes a esas "pasturas activas" no consiguen ningún efecto; descartan de esa forma la posible existencia de un tóxico mineral. De esas pasturas seleccionan las siete especies más comunes, de ellas solamente el *Solanum malacoxylon* Sendtner (*Solanum glaucum* Dun.) demuestra tener capacidad para provocar las variaciones sanguíneas antedichas. Comprueban también que la mayor toxicidad dentro de la planta, la presentan las hojas; apareciendo los tallos como inactivos (Garcés y Tilley, 102).- El extracto acuoso de las hojas mostró actividad similar a las mismas; tornándose inactivo por calcinación; lo cual indica la naturaleza orgánica y la hidrosolubilidad del principio tóxico contenido en el *Solanum malacoxylon*. Informan que una dosis única de 5 g ocasiona variaciones en el nivel Ca y P en sangre de bovinos; e indicando como do

sis mínima efectiva en ovinos, de 0,5 a 1 g. Todas las plantas de duraznillo blanco estudiadas hasta ese momento presentaron actividad tóxica, cualquiera sea su zona de origen.

En ese mismo Congreso, Carrillo y colaboradores(36) comunican la reproducción experimental en bovinos dosificados periódicamente con *Solanum malacoxylon*, de un cuadro clínico, patológico y bioquímico similar al Enteque Seco. Administraron extracto acuoso en cantidad equivalente a 25 g de hojas desecadas de duraznillo, 2 veces por semana; esto, es una dosis semanal total de 50 gramos. De fundamental importancia ha sido esa reproducción experimental del Enteque Seco.

En 1967, Carrillo y Worker publican (38,39,268), sus estudios sobre la enfermedad espontánea y experimental, en Buenos Aires y en Londres (Worker y Carrillo, 38,39,268) siendo citados de allí en más con mucha frecuencia por distintos autores en todo el mundo; calificados investigadores de diversas nacionalidades comenzaron a estudiar los notables efectos de esa solanacea sudamericana.

Gaggino, Deshpande y Tilley (1967) (93) obtienen experimentalmente lesiones similares a las del Enteque Seco en ratas mediante la administración oral repetida de extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* previamente incubado en líquido ruminal. El extracto acuoso que no había sufrido la acción de la flora ruminal, no presentó actividad tóxica. Consideran la hipótesis de que el principio activo del duraznillo blanco sea activado durante su permanencia en el rumen.

En 1968 Camberos y colaboradores obtienen lesiones de calcificación en cobayos (24) y Masselin, Monesiglio

Abadie y Rossi (1969) comunican la aparición de lesiones de calcificación en arterias, corazón y riñones en ratas, suministrando extracto etéreo de *Solanum malacoxylon* en solución oleosa por vía oral durante largos períodos. Señalan la semejanza de esas lesiones con las producidas por el dihidrotaquisterol, y descartan reacciones calcifilácticas en esas experiencias. (163).

Extractos etéreos en solución oleosa de otros vegetales (*Alternanthen philoxeroides*, *Aster squamatus*, *Polygonum aviculare*, *Bromus unioloides* y *Medicago sativa*) no ocasionaron lesiones aún después de 36 aplicaciones. (Masse lin, Gaggino, Monesiglio y Parodi, 1971). (164).

También en 1969, Gaggino reproduce lesiones típicas de arterioesclerosis en ovejas estudiando en profundidad y paulatinamente el desarrollo de las mismas en cuanto a los aspectos macroscópicos y especialmente microscópicos, (90).

Rossi y colaboradores (216) describen lesiones tisulares en conejos, detectando lesiones miocárdicas y vasculares por microscopía óptica ya 24 horas después de la tercera dosis.

En 1970, Hector y col. obtienen lesiones de calcificación en tejidos blandos de cobayos dosificados con *Solanum malacoxylon* (116).

Administrando 5 gramos de hojas de duraznillo en forma de extracto acuoso dos veces por semana, Camberos y Davis (27) encuentran que la cupremia y magnesemia no presentan modificaciones significativas. En orina aumenta la excreción (2-7%) de calcio, pero la absorción es mucho mayor. Concluyen que la calcemia aumenta por una mayor absorción intestinal y no por movilización del calcio existente

en el organismo. Semejantes resultados observan para el fósforo, y la existencia de una correlación estrecha entre ambos valores. Todas las ovejas tratadas mostraron / lesiones de calcificación.

Reinoso Castro (1970) reproduce también experimentalmente en bovinos al Enteque Seco por intoxicación progresiva con duraznillo blanco (207). Comunica además que los animales sin tratamiento recuperan estado, pero las lesiones macroscópicas no regresan.

Otra intoxicación experimental en bovinos realizaron Carrillo y colaboradores en 1971 (40); observan anorexia, marcada pérdida de peso, aumento de calcio y fósforo inorgánicos en sangre, lesiones típicas de Enteque Seco y gran depreciación comercial de la res.

Sostienen que el Enteque Seco, la intoxicación experimental con *Solanum malacoxylon* y la hipervitaminosis D podrían reconocer un mecanismo patogénico similar. Agregan que la sustancia tóxica sería transformada en el tracto digestivo, provocando un aumento en la absorción intestinal de calcio y fósforo.

Döbereiner y colaboradores, 1971 (74), reproducen en Brasil la afección que ellos denominan Espichamento mediante la administración de *Solanum malacoxylon*; concluyen que la enfermedad es causada directamente por la ingestión repetida de pequeñas cantidades del referido vegetal. Y recalcan que consiguen reproducir la enfermedad en una región muy distante (Río de Janeiro) de aquella en que la afección se presenta espontáneamente (Mato Grosso) en un / medio ecológico completamente diferente.

Por la administración oral de extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* en ratas, incubado o sin incubar, Carrillo (31, 32) obtuvo falta de crecimiento, anemia, minerali

zación de tejidos blandos e hipercalcemia. Ambos tratamientos ocasionaron severas lesiones macro y microscópicas en el sistema cardiocirculatorio, riñones y estómago, tras 5 a 10 semanas de intoxicación.

Camberos (23, 26) consigue nuevamente lesiones de / calcificación en ovinos en un nicho ecológico distinto con la sola administración de un extracto acuoso de *Solanum / malacoxylon*.

Mautalén, 1971 (166) publica sus estudios sobre los efectos que ejerce el *Solanum malacoxylon* en el metabolismo mineral del conejo. Determina que resulta acelerada la velocidad de resorción ósea, aumenta la absorción intestinal y la eliminación renal de calcio y fósforo; para obtener esos resultados trabaja con calcio y fósforo radioactivos. El efecto renal, según explica, parecería ser secundario a los cambios producidos en los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina 24 horas después de la administración del extracto acuoso, manteniéndose bajos los 2 días siguientes. La calcemia basal solo aumentó significativamente 24 horas postdosis. El extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* mostró actividad para aumentar la fosfatemia administrado por vía subcutánea. No encuentra cambios significativos en la eliminación renal de hidroxiprolina, pero comunica una caída notable en la depuración de creatinina. Según esos estudios, concluye que el *Solanum malacoxylon* actúa en forma similar a la vitamina D aumentando la absorción intestinal de calcio y la osteólisis; pero que esos efectos, en el caso de la mencionada solanacea, se presentan con mayor rapidez y tienen menor duración que cuando son producidas por la vitamina D. Comunica también que estudios preliminares de Puche y Romano indican que el *Solanum malacoxylon* puede provocar lisis ósea en cultivos de

hueso "in vitro".

Finalmente, del año 1971 pueden mencionarse los estudios efectuados por Sandon, Vagg y Döbereiner en Inglaterra referidos a bovinos; trabajando con isótopos radioactivos, concluyen que los efectos del *Solanum malacoxylon* estarían mediados por un gran incremento en la absorción intestinal del calcio (227).

Wase, 1972 (258) informa un incremento en la actividad de captación del calcio (Calcium binding activity) en el ileon del conejo por efecto del *Solanum malacoxylon* (ver capítulo C)

Ousavaplangchai presenta una tesis en Viena (184)/ en la que comunica la intoxicación experimental de cobayos por vitamina D₃ y por *Solanum malacoxylon*. Realiza el estudio macro y microscópico comparativo, sin encontrar diferencias morfológicas significativas entre ambos grupos. El duraznillo blanco fue administrado en forma de extracto acuoso, con un equivalente de 400 mg de hojas por día, durante 4 semanas (cada semana 5 días).

Djafer y Davis (72) concluyen que el principio activo es probablemente un glicósido, y por sus características cromatográficas en columnas de Sephadex G-25, consideran que tienen un peso molecular de 1000 a 2000.

En tiroides y paratiroides de ovinos, cobayos y ratas intoxicados con *Solanum malacoxylon*, Carrillo realiza estudios de microscopía óptica y electrónica. (31,33) En las células parafoliculares (células C de la tiroides) observa hipertrofia, hiperplasia, degranulación y vacuolización del citoplasma; cambios que considera como un índice de aumento en la secreción de calcitonina en respuesta a la hipercalcemia provocada por el *Solanum malacoxylon*. Las paratiroides las encuentra atrofiadas y con caracte--

rísticas citológicas propias de una menor actividad. Describe aumentos de la calcemia en las 3 especies estudiadas; en cobayos y ratas usa extracto acuoso simple y extracto acuoso previamente incubado en líquido ruminal. En ambos casos aumenta la calcemia, aunque el efecto es mayor en el segundo caso.

En el material proveniente de esos mismos animales, Carrillo estudia y publica (34) los efectos demostrados / por el *Solanum malacoxylon* en el sistema óseo. En resumen observa radiológica y microscópicamente, un aumento en la densidad ósea, sin alteraciones macroscópicas de las líneas anatómicas. Siguiéndolo a Collins (45) denomina al proceso como de osteoesclerosis. Las técnicas utilizadas (microradiografía y microscopía de fluorescencia) le permitieron revelar la aposición de tejido óseo de reciente formación en el hueso compacto, endosteo y periostio. Para la visualización por microscopía de fluorescencia recurre a la inyección de oxitetraciclina, aprovechando la // propiedad de la misma de formar complejos con las superficies óseas de reciente formación, que producen luego una coloración amarilla fluorescente con luz ultravioleta. Las alteraciones observadas, le permiten sugerir un mecanismo fisiopatológico similar al efecto producido por un exceso prolongado de vitamina D.

Respecto a la naturaleza química del tóxico presente en el *Solanum malacoxylon* se refiere López en 1973.- (155). En hojas desecadas y molidas realiza una extracción con alcohol metílico. Esa solución la fracciona con distintos solventes, y con las fracciones resultantes determina su actividad en bovinos, ovinos y conejos.

El sólido obtenido del referido proceso es sometido a cromatografía en papel, separándose en varias ban--

das (que el autor agrupa en 5 zonas). Solamente 2 bandas presentaron los efectos tóxicos característicos del *Solanum malacoxylon*; esas bandas tenían una coloración marrón. Las otras 3 zonas de los cromatogramas carecían de actividad. Concluye el autor que puede tratarse de varios productos con similar estructura química, o bien una sola sustancia tóxica degradada en el procesado con los distintos solventes, y que varía sus propiedades cromatográficas, pero conservando los efectos biológicos característicos. Postula la existencia de un glicósido tóxico; lo que explicaría la intensa solubilidad en metanol y la insolubilidad en otros solventes.

Con el objeto de investigar la relación del principio activo del *Solanum malacoxylon*, con la hormona paratiroides, calcitonina y vitamina D, Campos, Ladizesky y Mautalén realizan en 1972 y publican en 1973 un muy interesante y esclarecedor trabajo (28). Administran *Solanum malacoxylon* a ratas previamente tiroparatiroidectomizadas; a ratas deficientes en vitamina D y a animales normales (testigos). Concluyen que en las ratas tiroparatiroidectomizadas y testigos, la administración de *Solanum malacoxylon* provoca un aumento transitorio del fósforo sérico y una disminución precoz del calcio. Dosis repetidas diariamente provocaron un aumento de la calcemia, mucho más manifiesto en las ratas tiroparatiroidectomizadas que en los animales normales; aumentando también significativamente el calcio sérico en las ratas carenciadas en vitamina D. Sugieren los referidos autores que esa notable diferencia entre los dos grupos primeramente citados, se debería a un aumento en la descarga de calcitonina y una inhibición en la secreción de paratohormona; que, en los animales intactos, trataría de contrarrestar la hi--

percalcemia.

Concluyen que el *Solanum malacoxylon* aparentemente actúa sobre el metabolismo de calcio y fósforo sin mediación de calcitonina, hormona paratiroidea o vitamina D.

O'Donnell y Smith (180) miden "in vitro", mediante cultivo de segmentos intestinales, la capacidad de las células de la mucosa para captar calcio radioactivo (Ca^{45}). Encuentran una marcada similitud entre el *Solanum malacoxylon* y la vitamina D_3 en su acción sobre la mucosa entérica. Concluyen que el referido vegetal aumenta la absorción intestinal del calcio.

Según sus estudios, considera Humphreys (120) que / el principio activo del *Solanum malacoxylon* es soluble en agua, metanol, etanol e isopropanol; siendo insoluble en éter de petróleo, éter dietílico y benceno. Dice que no es un lípido, vitamina liposoluble, proteína, aminoácido o alcaloide. Sus resultados le permiten afirmar que no es vitamina D y posiblemente tampoco un glicósido. Por la naturaleza de sus efectos biológicos, señala que resulta similar a algunos metabolitos de la vitamina D (25-OH-D_3 o $24,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$), pero que difieren en su comportamiento frente a distintos solventes.

Wasserman publica en 1974 sus interesantes estudios realizados en pollos (259). Se basa en las observaciones de Omdahl y De Luca (182), que comprobaron que por efecto de una dieta con alto contenido de estroncio estable resulta bloqueada la conversión de 25-OH-D_3 en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por las enzimas del riñón. Esa falta de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, forma metabólica activa de la vitamina D, se traduce en una depresión de la absorción intestinal de calcio por inhibición en la síntesis de proteína de conjugación del calcio (calcium-binding protein, CaBP). El efecto inhibitorio del es

troncio puede ser anulado por la administración de $1,25(OH)_2D_3$, pero no por $25-OH-D_3$. El solanum malacoxylon también mostró la capacidad de revertir ese proceso de bloqueo inducido por el estroncio, evidenciando así un efecto similar al $1,25(OH)_2D_3$ en la mucosa intestinal.

Ladizesky, Mautalén y Camberos (141) administran Solanum malacoxylon a ovinos (por vía oral e intramuscular) conejos y ratas (vía oral y subcutánea): concluyen que el duraznillo blanco tiene efecto también por vía parenteral pero que su efectividad biológica es considerablemente mayor "per-os".

Uribe, Holick, Jorgensen y De Luca (249) confirman la capacidad del Solanum malacoxylon de estimular el transporte intestinal de calcio en ratas carenciadas en vitamina D, y que esos efectos son independientes de la referida vitamina. También afirman, según sus conclusiones, que el Solanum malacoxylon es incapaz de movilizar calcio del tejido óseo. Este resultado se contrapone con las comunicaciones de otros investigadores, y fué motivo de polémica entre los distintos autores.

Tökarnia y Döbereiner (245) publican un estudio complementario de sus estudios comentados anteriormente (74). Realizan el estudio de distribución del Solanum malacoxylon en la región de Mato Grosso, señalando que lo hace especialmente en suelos arcillosos. La distribución de la planta coincide con las áreas de ocurrencia del "Espichamento". Además del Solanum malacoxylon de hojas glabras, encuentran una variedad pilosa identificado como Solanum malacoxylon variedad brachychaeta por el Dr. C.V. Morton / del Museo Nacional de Ciencias Naturales del Instituto Smithsonian en Washington; variedad que demuestra tener los mismos efectos tóxicos. El Solanum malacoxylon varie

dad brachychaeta se diferencia de la variedad tradicional solamente por presentar en sus hojas muy finas vellosidades visibles a ojo desnudo mediante observación atenta.(73).

En animales afectados de la enfermedad y retirados de las zonas con duraznillo blanco, después de 4 y 16 meses; informan una regresión parcial de las lesiones. Las alteraciones del tejido conjuntivo permanecen, e incluso son más relevantes; pero encuentran menor cantidad de calcio depositado. La existencia de procesos de descalcificación postlesional, es sin duda un hallazgo de trascendencia que merece estudiarse en detalle. Resultados similares han sido obtenidos por Hänichen en Alemania (comunicación personal, enero de 1977), quien continúa sus estudios en esa dirección.

Tokarnia y DÜbereiner encuentran que el duraznillo blanco recolectado dos años antes y conservado a temperatura ambiente mantiene inalterable su toxicidad. Consiguen reproducir el "Espichamento" en bovinos de 2 a 3 años de edad con una dosis sumamente baja (0,04 g/kg de peso/semana, administrada durante 16 semanas). Dosis únicas de 10 gramos/kg producen calcificaciones de similar magnitud que pequeñas dosis repetidas en el sistema cardiocirculatorio y bastante más leves en los pulmones.

Lawson, Smith y Wilson (148) comunican también que el extracto de Solanum malacoxylon induce la formación de proteína de conjugación del calcio (CaBP).

La administración diaria de 300 mg de Solanum malacoxylon es capaz de iniciar la curación de las alteraciones óseas en ratas raquílicas (Ladizesky, Cabrejas, Labarrere y Mautalen, (140); para evaluar esos resultados recurren a la observación radiológica de la placa epifisaria

ria. El efecto antirraquítico fué menor que el obtenido con 200 U.I. de vitamina D_3 . Tanto el Solanum malacoxy--lon como la vitamina D_3 mostraron igual capacidad para estimular la absorción intestinal del calcio; recalcando que ese efecto aparece más precozmente y es de menos duración cuando se trata de Solanum malacoxylon. Tambiénre marcan la similitud funcional (al menos en ciertos aspectos) entre el duraznillo blanco y el 1,25 dihidrocolecalciferol.

El trabajo que publican Von Herrath, Kraft, Offermann y Schaefer señala bien a las claras el interés despertado en Medicina Humana por el Solanum malacoxylon(118) Proponen al referido vegetal como terapéutica alternativa para el $1,25(OH)_2D_3$ en los trastornos del metabolismo cálcico relacionados con la uremia. En ratas nefrectomizadas encuentran que el Solanum malacoxylon es capaz de aumentar la absorción intestinal del calcio; y para comprobarlo recurrieron al empleo de un isótopo radioactivo (Ca^{47}). También comunican que el Solanum malacoxylon muestra ese mismo efecto en pacientes mantenidos con hemodiálisis; constituye ésta la primera comunicación sobre los efectos del Solanum malacoxylon en la especie humana. Demuestran irrefutablemente que los efectos del Solanum malacoxylon son independientes de la presencia o no de los riñones, en contraste con la vitamina D que no actúa en ausencia de los mismos. Consideran también que el duraznillo blanco provoca una movilización de calcio del tejido óseo. Concluyen remarcando la similitud de efectos entre el Solanum malacoxylon y el 1,25 dihidroxicolecalciferol, y agregan que sus conclusiones no pretenden ser solamente de interés teórico, sino demostrar que el vegetal considerado está en condiciones de sustituir al 1,25

$(OH)_2D_3$ en terapéutica. El $1,25(OH)_2D_3$ sintético se produce por el momento en pequeñas cantidades y su elevado costo impide un empleo terapéutico corriente.

Döbereiner y Dämmrich (1974) (75) estudian también los cambios óseos en animales experimentalmente intoxicados con *Solanum malacoxylon* por administración repetida.- Las lesiones que puntualizan son mielofibrosis, hiperostosis endo y periosteal, y disturbios en el metabolismo de fibroblastos y osteoblastos con formación de sustancia fundamental anormal.

En 1975, Wasserman publica una excelente revisión sobre los efectos del *Solanum malacoxylon* y de otras plantas calcinogénicas identificadas hasta el momento (260).- Mucho de lo allí expuesto ha sido resumido en páginas anteriores. Podría resultar de interés comunicar sus consideraciones sobre la naturaleza química del tóxico presente en el *Solanum malacoxylon*. Señala que a pesar de la similitud de efectos biológicos no es el $1,25(OH)_2D_3$ por si mismo; así se deduce de su solubilidad diferente y distinto peso molecular. Llama la atención sobre la aplicación terapéutica que podría tener el referido principio en determinadas enfermedades humanas y animales. Finalmente, plantea un interrogante dirigido a los especialistas en Fisiología Vegetal: Qué función cumplen esas sustancias similares al $1,25(OH)_2D_3$ en el reino vegetal?

Wasserman y colaboradores (262) calculan que el equivalente de vitamina D del *Solanum malacoxylon* es de alrededor de 300.000 U.I. por kilogramo.

En un trabajo de Walling y colaboradores (257) aparece la denominación de *Solanum glaucophyllum* para el vulgarmente llamado duraznillo blanco, que en este caso, di-

cho sea de paso, había sido recolectado en las cercanías de La Plata. Confirman los efectos similares a la hormona $1, \alpha 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (forma activa de la vitamina D_3) en el transporte intestinal del calcio. Demuestran que el *Solanum glaucophyllum* compite con la referida hormona en los receptores cromáticos de las células de la mucosa intestinal; así explican los efectos ejercidos por el vegetal independientemente de la presencia o no de tejidos renal. En cultivos de tejido óseo confirman que el *Solanum malacoxylon* es un potente estimulante de la resorción ósea. Confirman de esta manera la afirmación de Mautalén (166) y de Campos, Ladizesky y Mautalén (28); e indican que la afirmación en contrario efectuada en 1974 por Uribe y otros es incorrecta (249). Más adelante volveremos sobre esta cuestión que no está definitivamente aclarada; recientes estudios demuestran un efecto inhibitor de la resorción ósea por efecto del *Solanum malacoxylon*. (Dos Santos y otros, 1976) (79).

Kraft, Von Herrath, Offermann y Schaefer (133) encuentran un efecto curativo evidente del *Solanum malacoxylon*, similar a la vitamina D_3 en lesiones raquílicas a nivel epifisiario inducidas experimentalmente en ratas; e indican que la actividad antirraquílica del extracto acuoso de 50mg de *Solanum malacoxylon* equivale a una dosis de 0,35 U.I. de vitamina D_3 ; el proveniente de 100 mg a 0,69 U.I. de vitamina D_3 y el extracto de 200 mg equivale a 0,99 U.I. de vitamina D_3 . Trabajaron en ratas sometidas a una dieta especial carente de vitamina D; de allí que sea de gran importancia el no detectar 25-OH-D_3 en suero de los animales controles y tampoco en los tratados con *Solanum malacoxylon*. - Por el contrario, se evidenció en grandes cantidades en las ratas suplementadas con vitamina D_3 . Es otra corroboración

de que el *Solanum malacoxylon* es capaz de aumentar el transporte intestinal de calcio y fósforo directamente, sin necesidad de sufrir previamente procesos de hidroxilación en hígado y riñón, tal como requiere el colecalciferol.

Humphreys, Basudde, Varghese y Moorhead(121) publican en 1975 una reseña de los estudios efectuados hasta ese momento con plantas calcinogénicas. Opinan que el efecto hiperfosfatémico del *Solanum malacoxylon* es secundario al aumento de la absorción intestinal del calcio inducido por una mayor síntesis de proteína de conjugación del calcio en las células de la mucosa. La naturaleza química del tóxico, seguía sin ser aclarada; pero indicaban que el principio activo mostraba parecidos con el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ó al $1\alpha\text{-OH-D}_3$. Señalan que los efectos biológicos del *Solanum malacoxylon* están en dependencia con la especie animal dosificada, métodos de administración, cantidad y duración de la exposición al tóxico. Esto explicaría las frecuentes comunicaciones contradictorias sobre el tema.

Döbereiner, Done y Beltran (76) consiguen un cuadro de Enteque Seco en terneros recién ~~destetados~~ por administración oral repetidas de hojas de duraznillo blanco. Dejan en claro, no obstante, que los terneros son mucho menos susceptibles a la acción del tóxico que los bovinos adultos.

Una nueva reproducción experimental del Enteque Seco en bovinos fué realizada por Riet Correa y colaboradores(210) Para ello administraron 100 g diarios de hojas de *Solanum malacoxylon* mezcladas con heno de alfalfa, a un bovino hembra procedente de una zona libre de la enfermedad; dicho tratamiento se prolongó por espacio de 32 días. Obtienen un cuadro típico de la afección, aunque más intenso que en los

casos espontáneos estudiados.

Reemplazando el agua de bebida en pollos, por un extracto acuoso que contiene el equivalente a 5 g de Solanum malacoxylon por 100 ml, Basudde y Humphreys(10) encontraron hipercalcemia, hipomagnesemia, hipofosfatemia, hipouricemia y disminución de la actividad de fosfatasa alcalina en suero. También encuentran disminuido el porcentaje de cenizas en tibia y baja de peso. Los resultados obtenidos, los consideran similares a la hipervitaminosis D₃ en pollos.

Los mismos autores publican (9) sus investigaciones sobre los efectos del Solanum malacoxylon en conejos y su inhibición por actinomicina D. Administran una sola dosis de extracto acuoso equivalente a 2,5 g de hojas desecadas; después de 4-8 horas encuentran hiperfosfatemia, pero ese efecto no fué acompañado por cambios significativos en los niveles plasmáticos de calcio, magnesio, proteínas totales, albúmina, urea o creatinina. Después de 24 horas encuentran un incremento en la excreción urinaria de calcio, magnesio y fósforo inorgánico, pero no hallan variaciones significativas en el nivel de hidroxiprolina. También concluyen que en conejos mantenidos a dietas con una concentración adecuada de calcio y fósforo, el Solanum malacoxylon no causa resorción ósea. El efecto hiperfosfatémico del vegetal es inhibido por administración de actinomicina D, sustancia que bloquea la síntesis proteica a nivel subcelular. Esto parece corroborar que los efectos del Solanum malacoxylon están mediados por una transcripción ADN-ARN y posterior síntesis proteica a nivel intestinal.

Moorhead y colaboradores (172) confirman la capacidad del Solanum malacoxylon para elevar la concentración de calcio y fósforo en ratas mantenidas con una dieta raquitó

gena; en esas experiencias, el extracto acuoso de duraznillo, resultó incapaz de movilizar calcio "in vitro" en cultivos de tejido óseo.

Ladizesky, Cabrejas, Montoreano y Mautalén (142) informan un rápido incremento de la absorción intestinal de calcio y fósforo radioactivos, tras la administración de Solanum malacoxylon a ratas normales, nefrectomizadas o carenciadas en vitamina D.

Dämmrich, Döbereiner, Tokarnia y Done (52) publican un muy completo estudio sobre las alteraciones esqueléticas inducidas por la intoxicación con Solanum malacoxylon en bovinos. En líneas generales los hallazgos coinciden con aquellos descritos por Döbereiner y Dämmrich en 1974.(75).

En 1976 se realizan experiencias con Solanum malacoxylon en porcinos (78). Done, Tokarnia, Dämmrich y Döbereiner intoxican en forma crónica (dosis repetidas) a cuatro cerdos. Clínicamente observan pérdida de peso, anorexia y trastornos locomotores. No observaron lesiones macroscópicas, con excepción de una pequeña placa de calcificación en el endocardio de un animal. Histológicamente encuentran calcificaciones en fibras elásticas y tejidos blandos. Las lesiones ba nivel óseo eran considerables y similares a las descritas en bovinos. Concluyen que el cerdo es mens sensible a los efectos tóxicos del vegetal que nos ocupa (comparado con bovinos y ovinos), lo que puede deberse a diferencias metabólicas en esa especie, o a que el tóxico resulte potenciado en el tracto digestivo de los rumiantes.

La enfermedad fué nuevamente reproducida en vacunos, (Nosedá y colaboradores, 179), ensayado un tratamiento en base a ficocoloides quelatados y constatada la total ineficacia del mismo para hacer regresar las lesiones de calci-

ficación en tejidos blandos.

Basudde y Humphreys(1976)(11) publican nuevos estudios en ratas; hallan que el Solanum malacoxylon causa una rápida hiperfosfatemia y disminución de la actividad plasmática de fosfatasa alcalina, efectos típicos del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. También aumentó el nivel plasmático de calcio y citrato, y una disminución del magnesio, cambios todos mencionados en la hipervitaminosis D. La administración prolongada a ratas carenciadas en vitamina D, produjo poliuria, hiper calciuria, hiperfosfaturia, hipermagnesuria, aumentó de hidroxiprolina total en orina y aumento de hexosaminas totales en hueso. Señalan que esos efectos pueden ser producidos por hiperparatiroidismo, administración de extracto paratiroideo, dosis altas de vitamina D_3 ó de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La conclusión final es que el principio activo del Solanum malacoxylon es capaz de causar movilización mineral del hueso y disolución de la matriz orgánica ósea.

Collins, Capen y Döbereiner (46) comunican que los cambios ultraestructurales encontrados en células C de la tiroides y en paratiroides de bovinos intoxicados con Solanum malacoxylon, son similares a los observados por administración de vitamina D (30 millones de U.I./día) por intervalos de 3 a 30 días.

Por su parte Boland y colaboradores (15), describen el aislamiento de fracciones lipo e hidrosolubles con capacidad para aumentar la fosfatemia en conejos a partir de extracto acuoso de Solanum malacoxylon incubado "in vitro" en líquido ruminal. La fosfatemia y la calcemia aumentaron significativamente en ratas que recibieron la fracción liposoluble por vía oral, y en dosis única equivalente a 1 gramo de vegetal. Encuentran un comportamiento cromatográfico si

milar al 25 hidroxicolecalciferol para esa fracción parcialmente purificada mediante cromatografía en capa fina y en columnas de Sephadex LH-20.

Done, Döbereiner y Tokarnia (77) informan sobre las alteraciones observadas en el tejido conjuntivo de pulmones, sistema cardiocirculatorio y tendones en animales espontánea y experimentalmente intoxicados con Solanum malacoxylon.

Ruksan y Carrillo (225) estudian los efectos del extracto acuoso de Solanum malacoxylon incubado y sin incubarse administrado por distintas vías en ovinos; los parámetros investigados fueron calcemia y fosfatemia. Encuentran que con el extracto acuoso sin incubarse, el aumento de los niveles séricos de fósforo y calcio, fué significativo al ser dosificado "per os"; no observando, en cambio, variaciones al utilizar otras vías de administración. Con extracto previamente incubado en líquido ruminal, obtienen un resultado claramente positivo para todas las vías utilizadas. El aumento fué mayor y más rápido para la vía intravenosa, que por vía oral, intramuscular o subcutánea.

En 1976 (Dos Santos, Nunes, Nunes, De Barros, Wasserman y Krook) (79) se demostraron efectos tóxicos severos a nivel óseo dentro de las 12 horas posteriores a la administración intragástrica de extracto de Solanum malacoxylon en conejos. El primer cambio consiste en una inhibición de la osteolisis osteocítica, con la consecuente osteopetrosis y ante posteriores estímulos negativos osteonecrosis; los osteoblastos resultan también negativamente influenciados, todo lo cual se traduce en osteopenia. La aplicación del concepto de osteolisis osteocítica es fundamental en la interpretación de la morfología ósea; la osteoclasia juega un

rol menor en la resorción, según esos autores. El efecto negativo en la resorción osteocitaria es considerada una acción directa del 1,25 dihidroxicolecalciferol; no detectaron hipercalcemia, por lo cualé excluyen un estado de hipoparatiroidismo-hipercalcitonismo en la patogénesis de las lesiones descriptas.

Los asombros y esclarecedores descubrimiento respecto al metabolismo de la vitamina D realizados en los últimos años y la cantidad de investigadores de primerísima jerarquía que con recursos modernos venían estudiando los efectos de la "planta sudamericana" durante años; hacían prever que el *Solanum malacoxylon* perdería en poco tiempo más su secreto. Y hoy, a medio siglo de las primeras experiencias realizadas por Collier en Buenos Aires, se conoce con seguridad la naturaleza del principio activo del vulgarmente llamado duraznillo blanco. Un equipo de investigadores de las Universidades de Cornell y Arizona, demuestran en 1976 que el referido principio calcinogénico es 1,25 dihidroxicolecalciferol-glicósido. Esas publicaciones son comentadas en detalle a continuación.

Peterlik, Bursac, Haussler, Hughes y Wsserman (204), aportan nuevas evidencias de que el *Solanum malacoxylon* tiene una sustancia de actividad similar al 1,25 dihidroxicolecalciferol, forma activa de la vitamina D_3 y responsable de la absorción de calcio y fósforo en el intestino. Administraron extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* por vía oral a pollos alimentados con dieta carente de vitamina D, e imposibilitados para sintetizar $1,25(OH)_2D_3$ por efecto inhibitorio del estroncio (bloqueo de la 1 alfa hidroxilasa a nivel renal). Antes de la administración del extracto, los animales no mostraban niveles detectables de $1,25(OH)_2D_3$

pero la actividad plasmática de dicha hormona aparece "dramáticamente incrementada", al decir de los autores; 6 a 12 horas después de la dosificación. La cuantificación de los niveles hormonales la realizan por medio de refinadas técnicas en las que utilizan moléculas marcadas con isótopos radioactivos. Concluyen por lo tanto que la 1 alfa-hidroxi lasa no es requerida por el principio activo del Solanum malacoxylon para ejercer sus efectos. Pero seguía sin dilucidar el porqué del distinto comportamiento del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el principio activo del Solanum malacoxylon frente a distintos solventes; y el peso molecular de este último (alrededor de 1000; Humphreys, 120), muy superior al del esteroide sintético. Estudios realizados con extracto acuoso purificado indicaban que la sustancia activa del duraznillo blanco no competía en forma efectiva con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ radioactivo, para conjugarse con los esterol-receptores de las células intestinales (hallazgo que se contrapone a lo manifestado por Walling y colaboradores, 256). Pero si el referido extracto era sometido previamente a la acción de Beta-glucosidasa, el comportamiento de los dos compuestos era exactamente igual en los esterol-receptores y frente a solventes orgánicos. La sustancia lipofílica liberada, presentaba las mismas características cromatográficas que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ marcado (en columnas micro-Celite y Sephadex LH-20) y demuestra por lo tanto ser muy similar en su polaridad a la referida hormona. Concluyen que Solanum malacoxylon contiene una molécula muy similar o idéntica al $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ combinada con 1 ó más carbohidratos; y que ese glicósido es posiblemente dissociado en el organismo, antes de que la actividad biológica se manifieste.

Continúan las investigaciones, muy cerca ya de la meta anhelada durante medio siglo por muchos estudiosos del

mundo entero. Pocos días después Haussler, Wasserman, McCain, Peterlik, Bursac y Hughes(115) entregan para su publicación un trabajo que marca una página memorable en la larga lista de estudios hasta aquí considerados. Y no resistimos a la tentación de escribir la traducción textual del título: "1,25 Dihidroxitamina D_3 -Glicósido: Identificación del Principio Calcinogénico del *Solanum malacoxylon*" Pero veamos en que resultados se basan esos investigadores El principio activo del *Solanum malacoxylon* es parcialmente purificado por extracción selectiva y cromatografía, y posteriormente hidrolizado con una mezcla de glicosidasas. De este proceso obtienen una sustancia soluble en cloroformo con los mismos efectos biológicos que el $1,25(OH)_2D_3$. El referido principio activo presentó iguales propiedades cromatográficas (diversas técnicas) que $1,25(OH)_2D_3$ tritinado; el espectro de absorción ultravioleta fué idéntico. Y finalmente, comparando ese factor con $1,25(OH)_2D_3$ sintético en el espectrómetro de masa, resulta imposible diferenciarlos. Con los resultados de esas y anteriores investigaciones, esos autores están en condiciones de afirmar que el esteroide activo presente en el *Solanum malacoxylon* es $1,25(OH)_2D_3$. La referida hormona ha sido encontrada en animales y seres humanos, pero no había sido detectada hasta el momento en el reino vegetal. Señalan que nuevos trabajos son necesarios para determinar la composición del carbohidrato (o carbohidratos) unido a ese esteroide, así como precisar la posición de conjugación. Sigue siendo un interrogante que rol juega ese fitodihidroxicolecalciferol en la fisiología del vegetal. Terminan expresando que se debe considerar la posibilidad de utilizar al esteroide proveniente del *Solanum malacoxylon* en terapéutica.

Kunz (137, 138) comunica los efectos que ejerce el *Solanum malacoxylon* con respecto a la concentración sérica del calcio, fósforo y magnesio tras su aplicación oral y parenteral en bovinos. Después de citar a varios autores que señalan la similitud de efectos con el $1,25(OH)_2D_3$, manifiesta que una investigación similar fué realizada por Ladizesky, Mautalen y Camberos (1974) en ovejas, ratas, conejos. En esta experiencia, administró el autor dosis únicas equivalentes a 20 y 50 gramos (en extracto acuoso) por vía oral. ~~oral~~

Las tratadas por vía intravenosa recibieron dosis equivalentes a 10, 20, 30 y 50 gramos. De todos los animales obtiene sangre venosa para determinación calcemia, fosfate-mia y magnesemia a los 15, 30, 60 minutos; y 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas posteriores a la dosificación. Encuentra que el tenor de fósforo inorgánico aumenta marcadamente 12 a 24 horas después, para alcanzar el máximo a las 48 horas; calcio y magnesio no mostraron variaciones significativas. Esa respuesta se obtuvo en todos los animales, si bien fué mucho más pronunciada cuando el extracto se administró por vía oral o intraruminal. Al decir del autor, es muy lógico pensar que esa diferencia se debería a que por vía oral la sustancia activa se pone en contacto más fácilmente con las células de la mucosa intestinal, en donde ejerce sus efectos; por vía intravenosa resultaría eliminada con mayor rapidez.

E. CALCINOSIS EXPERIMENTAL EN RATAS

I) Resumen

Se comprueba la capacidad del extracto acuoso de / Solanum malacoxylon sin incubación previa en líquido ruminal, de provocar lesiones de calcificación similares a las del Enteque Seco, en ratas carenciadas en vitamina D al ser administrado por vía oral.

Especial énfasis se puso en el estudio histopatológico, sin omitir empero manifestaciones clínicas y lesiones macroscópicas.

II) Antecedentes e Introducción

Gaggiano, Deshpande y Tilley comunican en 1967 la producción de calcificaciones aórticas evidenciables microscópicamente en ratas que recibieron 5 ml "per os" de extracto acuoso de Solanum malacoxylon previamente incubado en líquido ruminal, equivalentes a 500 mg de hojas secas, por animal y por día (93). En un lote que recibió igual dosis de extracto acuoso mezclado con líquido ruminal (en partes iguales) pero sin incubar, no observaron lesiones. El resultado fue igualmente negativo en tres / experiencias previas realizadas con extracto acuoso simple.

Como los mismos autores señalan, el uso del alimento como vehículo de la mezcla, motivó el rechazo por parte de los animales en estudio, por lo que la mayoría de los animales no ingirió en su totalidad la dosis calculada.

Dos años después Masselin, Abadie, Monesiglio y Rossi informan la producción de lesiones de calcinosis cardiocirculatorias y renales mediante la administración in

traestomacal de extracto etereo de duraznillo blanco en solución en aceite de maíz. Manifiestan que el aspecto exterior de las ratas dosificadas no mostró diferencias significativas con los lotes testigos. A la necropsia tampoco describen grandes diferencias, solamente zonas ligeramente blancogrisáceas en la corteza renal de algunos animales que habían recibido 18 y 36 dosis; equivalentes cada una de ellas a 20 mg de extracto etéreo. (163)

Carrillo (1971) consigue lesiones macro y microscópicas cardiocirculatorias, renales y gástricas en ratas Sprangue Dawley con extracto acuoso de duraznillo blanco incubado o sin incubar. En ambos casos los animales presentaron falta de crecimiento, anemia, hipercalcemia y mineralización de tejidos blandos a las 5 a 10 semanas de tratamiento. La dosis oral utilizada fue equivalente a 500 mg de hojas desecadas por animal y por día. (31,32)

La hipercalcemia y las modificaciones producidas / en las células C de la tiroides, así como en paratiroides (ver capítulo D); fueron de mayor magnitud en los animales tratados con extracto acuoso incubado en líquido ruminal, pero igualmente se presenta sin ese proceso previo.

La capacidad de aumentar la absorción intestinal de calcio en ratas por *Solanum malacoxylon* sin incubar, ha sido demostrada por diversos autores (Carrillo, 1971; Campos, Ladizesky y Mautalen, 1972; O'Donnell y Smith, en 1972; Ladizesky, Mautalen y Camberos, 1973; Uribe, Holick Jorgensen y De Luca, 1974; Ladizesky, Cabrejas, Labarre y Mautalén, 1974; von Herrath, Kraft, Offermann y Schaefer, 1974; Kraft, von Herrath, Offermann y Schaefer, 1975; Basudde y Humphreys, 1976; Boland, Skliar, Boland, Carrillo y Ruksan, 1976) tal cual fue comentado en el ca

pítulo anterior.

Recientemente Boland y colaboradores (1976) opinan que: "aparentemente el sistema intestinal de la rata no / está provisto de un mecanismo enzimático para la activación biológica del principio activo de Solanum malacoxylon tan eficaz como en el caso de herbívoros y ruminantes". Las investigaciones de Carrillo (1971) demuestran no obstante, que esa activación ocurre, aunque sea de magnitud mucho / menor que en herbívoros.

En esta investigación, se empleó una dieta carente de vitamina D, eliminando de esa forma el elemento fisiológico responsable de la absorción intestinal del calcio, según los conocimientos actuales; la dosis utilizada fue equivalente a 500 mg de hojas secas de Solanum malacoxylon por animal y por día en forma de extracto acuoso simple (no incubado). Todos los animales experimentalmente / intoxicados mostraron lesiones de calcinosis macroscópicamente detectables ya a las 14 dosis, como se detalla más adelante.

III) Material y Métodos

Se utilizaron 29 ratas Sprague-Dawley (SPF) (provis- tas por la casa Wiga, 8741 Sulzfeld, Estado de Baviera, Re- pública Federal de Alemania), con un peso promedio ini- -- cial aproximado a los 235 gramos.

Los animales fueron alimentados (ad libitum) duran- te toda la experiencia con una dieta especial carente en vitamina D (Altromin-sonderdiäten C 1017. Fabricante Al- -- tromin GmbH, 4937 Lage Lippe, Lange Strasse 40, República Federal de Alemania); con un contenido de calcio de 1,3% y un contenido de fósforo igual a 1,2%. La misma dieta es- pecial fue empleada por von Herrath, Kraft, Offermann y

Schaefer en 1974. (118)

Las ratas nº 1 al 11 fueron mantenidas 14 días con la referida alimentación antes de comenzar el suministro del tóxico; los animales 12 al 29 por su parte, estuvieron 60 días en esas condiciones.

Cada dosis de extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* en cantidad equivalente a 500 mg de hojas secas, con un volumen variable entre 2 y 2,5 cc; fue administrada / diariamente por vía intraestomacal con sonda esofágica / rígida de acero inoxidable (fotos 2 y 3). Veinte animales recibieron 7 dosis semanales, otros 9 permanecieron como animales testigos.

Los animales del grupo A (ratas nº 4, 9, 21, 22 y 24) fueron sacrificadas a la semana de intoxicación, tras recibir 7 dosis.

Grupo B (ratas nº 2, 3, 17, 15 y 23) se sacrificaron a las 2 semanas; recibieron en consecuencia 14 dosis.

Grupo C (ratas nº 1, 14, 18, 19 y 20) a las 3 semanas, 21 dosis.

Grupo D (ratas nº 5, 6, 12, 13, y 16), a las 4 semanas, 28 dosis)

El grupo E (ratas nº 7, 8, 10, 11 y 28) estaba constituido por testigos sacrificados después de haber permanecido con la referida alimentación durante períodos variables entre 30 y 90 días.

El grupo F finalmente, estaba integrado por los animales nº 25, 26, 27 y 29, que recibieron 2 cc diarios de agua destilada por vía intraestomacal. Fueron sacrificados a las 7, 14, 21 y 28 dosificaciones respectivamente.

Preparación del extracto acuoso: el *Solanum malacoxylon* utilizado fue recogido en el Partido de Berisso (Provincia de Buenos Aires) en marzo de 1975; secado a tempe-

ratura ambiente al abrigo de la luz solar. Manualmente se separaron los tallos de las hojas, utilizando solo estas. Ese material fue finamente molido y tamizado por el Dr. Wolfgang Kunz (2da. Clínica Médica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Munich), y utilizado en partes en una experiencia realizada en bovinos (9º Congreso Mundial de Buiatría, París 1976; Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 90 (1977); 69-72).

El extracto acuoso se preparaba cada día mezclando 500 mg de material pulverulento por animal en experimentación, con agua bidestilada (provista por H.Kerndl K.G.-Am Mitterfeld 8-8600 München 82). Después de permanecer en maceración 24 horas a temperatura ambiente era centrifugado a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, extraído el sobrenadante con una pipeta Pasteur provista de una pera de goma y ajustado el volumen de tal forma que correspondieran 2 cc por animal (Centrífuga Hettich-Rotixa, höchst.Drehzahl 9000 u/min.) (foto 1)

Los animales fueron sacrificados por inhalación de cloroformo (Art 2445-Chloroform-Merk, Darmstadt).

Las necropsias fueron realizadas según técnicas convencionales parcialmente adaptadas a esta investigación.- Los órganos de la cavidad abdominal se retiraban en su totalidad y todos a un tiempo, luego de haber localizado y recogido las glándulas adrenales; especial cuidado se puso en no dañar la aorta en esta operación. Se comenzaba luego a diseccionar la aorta en su bifurcación, sosteniéndola por su porción abdominal con una pinza hasta liberar aorta, corazón y pulmones; en ese momento se procedía a cortar esófago y tráquea.

Ya sobre la mesa, aorta y corazón eran separados de tráquea, esófago y pulmones. Finalmente, y comenzando por

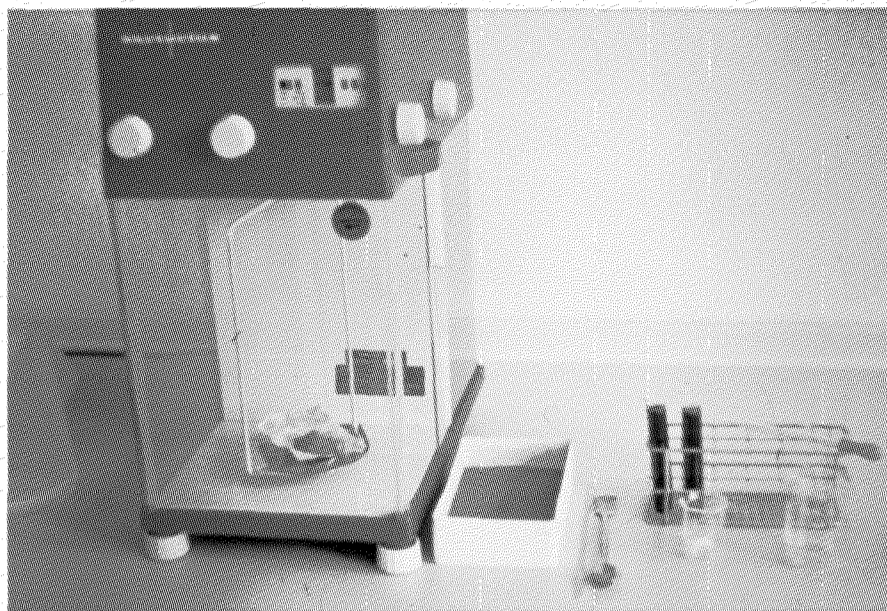


Foto 1: Preparación del extracto acuoso
Puede observarse *Solanum malacoxylon* pulverizado, y en los tubos el material macerado y centrifugado.

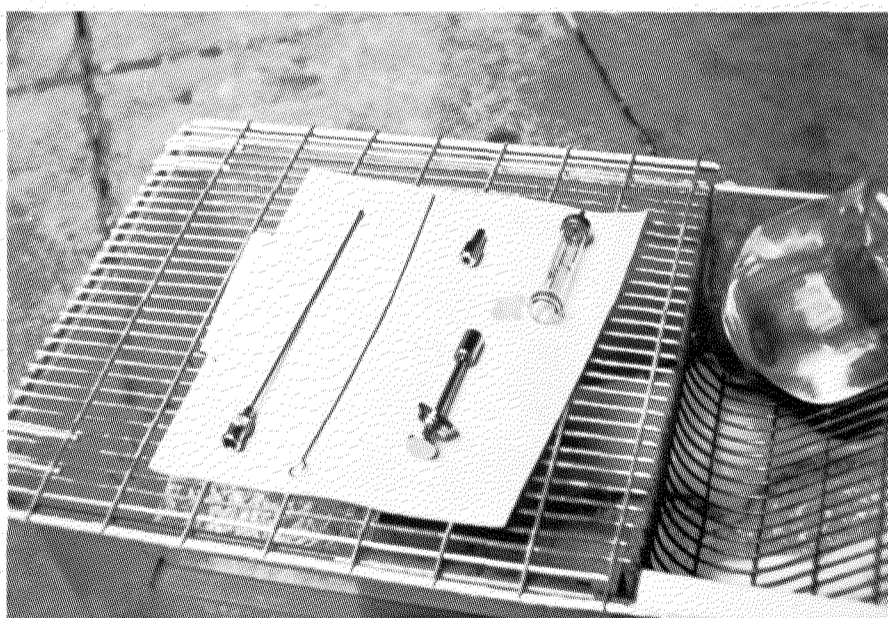


Foto 2: Instrumental empleado para administrar el tóxico

la porción posterior, se abría la aorta en toda su extensión utilizando una pequeña tijera, hasta entrar en corazón izquierdo, cortar miocardio y dejar las dos cavidades izquierdas a la vista. Esta operación es bastante más simple de lo que parece, siempre que se realice con tranquilidad y muy buena iluminación. En los animales que recibieron 14 o más dosis de extracto, la notable pérdida de elasticidad aórtica facilita en mucho ese corte longitudinal.

Las muestras recogidas para observación microscópica fueron fijadas en formol neutro (Art.3999-Formaldehydlösung min. 37% säurefrei für die Histologie-Merk, Darmstadt) diluido en agua corriente en proporción 1:7.

El material fue incluido en parafina, cortado y coloreado con hematoxilina y eosina y azul Alcian según // las técnicas corrientes. Para la coloración de von Kossa se siguió la técnica descrita por Romeis (213) efectuando la coloración "Rojo Nuclear" (Kernechtrot) como contraste; también según Romeis.

IV) Resultados

a) Manifestaciones clínicas

A medida que se sucedían las dosificaciones del tóxico, era notable la pérdida de estado general. Los animales presentaban pelos ásperos y sin brillo, cifosis y disminución notable del consumo de alimento. El peso corporal, controlado día por día, mostró una caída persistente en los lotes A, B, C, y D; no ocurriendo lo mismo con el lote E. En el grupo A, los cinco animales que lo integraban, acusaron al comienzo de la intoxicación 231,4 gramos de peso corporal promedio; siendo el valor medio final de 211 gramos al momento del sacrificio (7 dosis) (Tabla 1)

En el grupo B (14 dosis) esos valores fueron 231 y 175,8 (Tabla 2); Grupo C (21 dosis) 238,8 y 170,8 (Tabla 3) y finalmente en el grupo D: 240 y 193,2 (Tabla 4). En el grupo E (5 testigos) mantenidos durante períodos variables con dieta carente en vitamina D, se tenía un peso inicial promedio de 208 y de 245,8 en el momento del sacrificio (Tabla 5). Los integrantes del grupo F (4 animales que recibieron 2 cc de agua por día con sonda intraestomacal) mostraron grandes variaciones de peso y menor consumo de alimento. Aun cuando los pesos promedio inicial y final no fueron muy diferentes (249,5 y 247 respectivamente); se evidenció con claridad que el sondaje esofágico diario y la administración de 2 cc de líquido, constituye en sí mismo un factor traumático no despreciable, para explicar la disminución de apetito (tabla 6)

En los animales dosificados con extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* (grupos A, B, C y D) se observó diarreas con frecuencia.

La rata nº 4 murió tras 8 dosis; al parecer (ver / hallazgos de necropsia) por una complicación neumónica; todos los demás fueron sacrificados con cloroformo. Solamente en un caso (rata nº 2) se observó regurgitación parcial del material administrado y dificultades para // realizar el sondaje.

b) Hallazgos de Necropsia

Del grupo A, el animal nº 4 muerto después de 8 días de intoxicación, mostraba un proceso pleuroneumónico evidente. En tráquea aparecía gran cantidad de líquido espumoso y mocoide de color marrón. Aun cuando este animal había disminuído de peso considerablemente tras 8 dosificaciones, no mostró manifestaciones fuera de la normal al serle administrada la 8va dosis (11 de agosto de

TABLA 1 : VARIACIONES DEL PESO CORPORAL - GRUPO A

<u>Rata nº</u>	1) <u>Comienzo de la</u> <u>dieta especial</u>		2) <u>Comienzo de la</u> <u>intoxicación</u>	
	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>
4	20-7-76	215	3-8-76	240
9	20-7-76	210	17-8-76	227
21	3-8-76	180	3-X-76	205
22	3-8-76	195	3-X-76	240
24	3-8-76	185	3-X-76	245
		\bar{x} 197		\bar{x} 231,4

TABLA 2 : VARIACIONES DEL PESO CORPORAL - GRUPO B

<u>Rata nº</u>	1) <u>Comienzo de la</u> <u>dieta especial</u>		2) <u>Comienzo de la</u> <u>intoxicación</u>	
	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>
2	20-7-76	205	3-8-76	210
3	20-7-76	205	3-8-76	220
15	3-8-76	180	3-X-76	240
17	3-8-76	185	3-X-76	254
23	3-8-76	190	3-X-76	231
		\bar{x} 193		\bar{x} 231

(7 DOSIS DE 500 mg)

<u>3) Sacrificio</u>		<u>Diferencia en gramos</u>
<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>entre</u>
		<u>2 y 3</u>
12-8-76	197	- 43
24-8-76	222	- 5
10-X-76	197	- 8
10-X-76	195	- 45
10-X-76	244	- 1
	\bar{x} 211	\bar{x} - 20,4

(14 DOSIS DE 500 mg)

<u>3) Sacrificio</u>		<u>Diferencia en gramos</u>
<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>entre</u>
		<u>2 y 3</u>
17- 9 -76	155	- 55
17-8-76	149	- 71
17-X-76	180	- 60
17-X-76	215	- 39
17-X-76	180	- 51
	\bar{x} 175,8	\bar{x} - 55,2

TABLA 3 : VARIACIONES DEL PESO CORPORAL - GRUPO C

<u>RATA nº</u>	1) <u>Comienzo de la</u> <u>dieta especial</u>		2) <u>Comienzo de la</u> <u>intoxicación</u>	
	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>
1	20-7-76	200	3-8-76	210
14	3-8-76	180	3-X-76	244
18	3-8-76	190	3-X-76	255
19	3-8-76	190	3-X-76	225
20	3-8-76	190	3-X-76	260
		\bar{x} 190		\bar{x} 238,

TABLA 4 : VARIACIONES DEL PESO CORPORAL - GRUPO D

<u>Rata nº</u>	1) <u>Comienzo de la</u> <u>dieta especial</u>		2) <u>Comienzo de la</u> <u>intoxicación</u>	
	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>
5	20-7-76	215	3-8-76	240
6	20-7-76	200	3-8-76	230
12	3-8-76	185	3-X-76	220
13	3-8-76	180	3-X-76	240
16	3-8-76	185	3-X-76	270
		\bar{x} 199		\bar{x} 240

(21 DOSIS DE 500 mg)

3) <u>Sacrificio</u>		<u>Diferencia en gramos</u> <u>entre</u>
<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>2 y 3</u>
24-8-76	129	- 81
24-X-76	194	- 50
24-X-76	151	- 4
24-X-76	185	- 40
24-X-76	195	- 65
8	\bar{x} 170,8	\bar{x} - 48

(28 DOSIS DE 500 mg)

3) <u>Sacrificio</u>		<u>Diferencia en gramos</u> <u>entre</u>
<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>2 y 3</u>
31-8-76	204	- 36
31-8-76	197	- 33
31-X-76	180	- 40
31-X-76	170	- 70
31-X-76	215	- 55
	\bar{x} 193,2	\bar{x} - 46,8

TABLA 5 : VARIACIONES DEL PESO CORPORAL - GRUPO E (TESTIGOS)

<u>Rata nº</u>	<u>1) Comienzo de la dieta especial</u>		<u>2) Comienzo de la intoxicación</u>		<u>3) Sacrificio</u>		<u>Diferencia en gramos entre</u>
	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>1 y 3</u>
7	20-7-76	210	NO INTOXICADO		24-8-76	253	+ 43
8	20-7-76	215	NO INTOXICADO		31-8-76	265	+ 50
10	20-7-76	210	NO INTOXICADO		31-8-76	220	+ 10
11	20-7-76	210	NO INTOXICADO		31-8-76	229	+ 19
28	3-8-76	195	NO INTOXICADO		17-X-76	262	+ 67
		\bar{x} 208				\bar{x} 245,8	\bar{x} + 37,8

TABLA 6 : VARIACIONES DEL PESO CORPORAL - GRUPO F (TESTIGOS CON AGUA DESTILADA)

<u>Rata nº</u>	<u>1) Comienzo de la dieta especial</u>		<u>2) Comienzo la ad-ministr.de H₂O</u>		<u>3) Sacrificio</u>		<u>Diferencia en gramos entre</u>
	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>Fecha</u>	<u>Peso</u>	<u>2 y 3</u>
25	3-8-76	185	3-X-76	254	31-X-76	228	- 26
26	3-8-76	200	3-X-76	237	24-X-76	240	+ 3
27	3-8-76	185	3-X-76	267	10-X-76	269	+ 2
29	3-8-76	180	3-X-76	240	10-X-76	251	+ 11
		\bar{x} 187,5		\bar{x} 249,5		\bar{x} 247	\bar{x} - 2,5

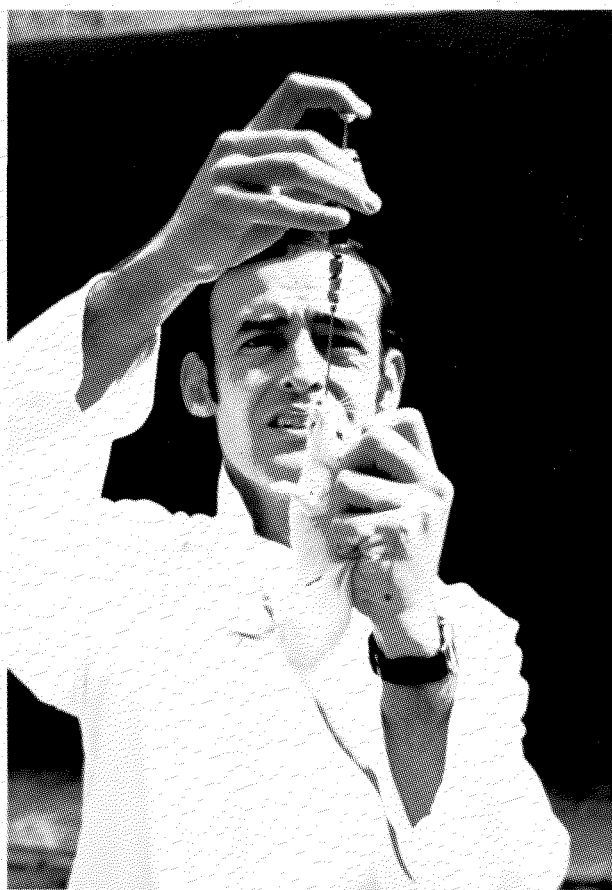
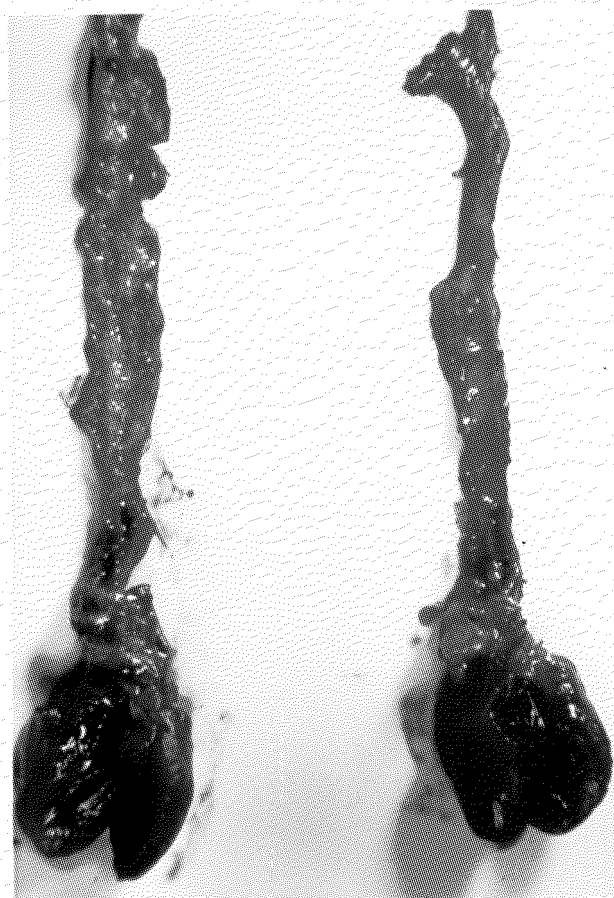


Foto 3: Administración intragástrica del extracto acuoso de *Solanum malacoxylon*.

Foto 4: Calcinosis aórtica: izquierda, rata nº 10 (testigo): superficie interna lisa, puede verse el origen de las arterias intervertebrales. Derecha, rata nº 5 (lote D): superficie completamente rugosa.



1976). Se trata pues, posiblemente, de un problema de regurgitación y flasa vía al efectuar el sondaje.

Los otros 4 animales del grupo (ratas nº 9, 21, 22 y 24) no presentaron lesiones macroscópicas de importancia. La rata 9 mostró procesos neumónicos localizados y una banda blanquecina entre corteza y médula renal. En la rata 22 se observaron en ambos riñones algunas manchas / blanquecinas externas y al corte pequeñísimas estrías de disposición radial; el tamaño de los riñones fue normal comparándolos con los de un testigo (rata 29). El sistema cardiocirculatorio no presentó lesiones. En la rata 22, el intestino aparecía distendido por gran cantidad de gas.

Los animales del grupo B (14 dosis) presentaron todos evidentes lesiones de calcinosis. En la rata nº 17, / la aorta podía apreciarse endurecida, ensanchada, con un color grisáceo y pequeñas líneas blanquecinas transversales; al corte longitudinal presentó una superficie interna completamente rugosa en toda su extensión. Las ratas 2, 3 y 23 mostraron similares lesiones aórticas, aunque algo menos extendidas, mientras que en el animal nº 15 se presentaron claras placas de calcificación, pero alternando con zonas al parecer normales. Solamente en la rata 3 fue posible constatar deposiciones calcáreas evidentes en epi, mio y endocardio; curiosamente ese mismo animal, fue el único que con 14 dosis o más no presentó lesiones renales evidenciables macroscópicamente. Las lesiones de nefrocalcinosis fueron manifiestas en el animal 2 y muy marcadas en las ratas 15, 17 y 23. La rata nº 15 mostró 2 pequeñas cavidades medulares al corte longitudinal del riñón derecho. En ninguno de los animales del lote se detectó hipertrofia renal. La rata 2 tenía un absceso periesofágico de 0,5 cm de diámetro; lo cual explica

TABLA 7 : LESIONES MACROSCOPICAS

	Rata nº	Corazón	Aorta	Riñón	Estómago	Intestino
GRUPO A (7 dosis de 500 mg)	4	-	-	-	-	-
	9	-	-	(+)	-	-
	21	-	-	-	-	-
	22	-	-	+	--	-
	24	-	-	-	-	-
GRUPO B (14 dosis de 500 mg)	2	-	++	+	-	●
	3	++	++	-	+	-
	15	-	+	++	-	-
	17	-	+++	++	++	-
	23	-	++	++	+	-
GRUPO C (21 dosis de 500 mg)	1	(+)	+++	++	++	-
	14	-	++	++	+	-
	18	-	-	+	-	-
	19	-	+++	+++	+	●
	20	-	+++	++	+++	-
GRUPO D (28 dosis de 500 mg)	5	-	+++	+++	++	-
	6	-	+++	+++	+	-
	12	-	+++	+++	+++	++
	13	-	+++	++	++	-
	16	-	+++	+++	++	-
GRUPO E (Testigos)	7	-	-	(+)	(+)	-
	8	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-
GRUPO F (Testigos)	25	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-

+++ : Alto grado de calcificación

++ : Claras lesiones de calcificación

+ : Calcificación leve

(+) : Presuntas lesiones de calcificación

- : Sin lesiones macroscópicamente detectables



Foto 5 : Nefrocalcinosis: intenso proceso de calcificación (rata nº 5)



Foto 6 : Nefrocalcinosis: riñón intensamente calcificado (derecha, rata nº 5). A la izquierda riñón normal (rata nº 10, testigo).

las dificultades que presentaba el sondaje diario en ese animal. Finalmente en el estómago de los animales 3, 17 y 23 fueron observadas manchas blanquecinas lineales, visibles en la superficie externa del fundus.

En el grupo C (21 días de intoxicación) las ratas 1, 19 y 20 presentaron las lesiones ya descritas en aorta, extendidas a toda su longitud; y menos evidentes en el animal 14. La rata Nº 18, por el contrario, mostró una aorta aparentemente normal, elástica de superficie endotelial completamente lisa y desde donde sin dificultad se veía el comienzo de las arterias intercostales; ésto último resulta muy difícil en la superficie rugosa e irregular de la aorta con calcinosis evidente.

Los riñones estaban visiblemente afectados en todos los casos; y con excepción de la rata 18, la calcinosis era también evidente en estómago.

Todos los animales de este grupo evidenciaron un mal estado general, con ausencia casi total de tejido adiposo; el intestino aparecía distendido por gas, y en algunos casos sin contenido sólido.

En el grupo D (28 dosis), las deposiciones cálcicas fueron claramente visibles en todos los animales (ratas 5, 6, 12, 13 y 16) a nivel aórtico, gástrico y renal. (Fotos 4, 5 y 6).

Llama poderosamente la atención el intenso grado de calcinosis de los animales 5 y 6, que no evidenciaron trastornos ante-mortem (salvo una caída de peso poco marcada), e incluso contaban con buena reserva de tejido adiposo.

En las ratas de los grupos E y F (9 animales testigos) no se observaron lesiones; solamente el animal Nº 7, mostró algunos puntos blanquecinos en estómago y riñón. En

todos los casos la necropsia se veía dificultada, en comparación con la de los animales intoxicados, por una mayor cantidad de grasa y sangre.

C) Estudio microscópico.

Corazón: sólo resultó afectado en unos pocos animales, y sin demostrar una relación directa entre la cantidad de tóxico administrado y la magnitud de las lesiones producidas.

En el grupo A, (cinco animales que recibieron 7 dosis de extracto acuoso de *Solanum malacoxylon*) solamente la rata Nº 4 presentó abundantes focos von Kossa positivos en el espesor del miocardio. (Foto 7). Con mayor aumento es dable observar que esas disposiciones cálcicas están constituidas por finos gránulos con localización intracitoplasmática, afectando a las fibras musculares total o parcialmente. La estriación transversal característica resulta conservada en las porciones sarcoplásmicas no afectadas de las fibras calcificadas en parte; lo mismo ocurre con los elementos miocárdicos vecinos a los focos calcinóticos.— Los corpúsculos von Kossa positivos no confluyen en masas de mayor volumen; se observan áreas de miolisis con dispersión de esos granos. Los vasos coronarios presentaron granulaciones similares en todo el espesor de su pared. (Foto Nº 8).

En dos animales del grupo B, (ratas 2 y 17) se encontraron algunas pocas granulaciones von Kossa positivas en vaso coronario. En el animal 2, por otra parte, se observan áreas de miolisis e infiltración inflamatoria mononuclear; y en los animales 15 y 17 fibras necróticas y fragmentadas pero no deposiciones cálcicas. La rata 3 contaba sí, con numerosos focos de calcificación miocárdica;



Foto 7: Corazón: fibras miocárdicas y pared de un vaso coronario presentando abundantes granulaciones von Kossa positivas. (Rata Nº 4).

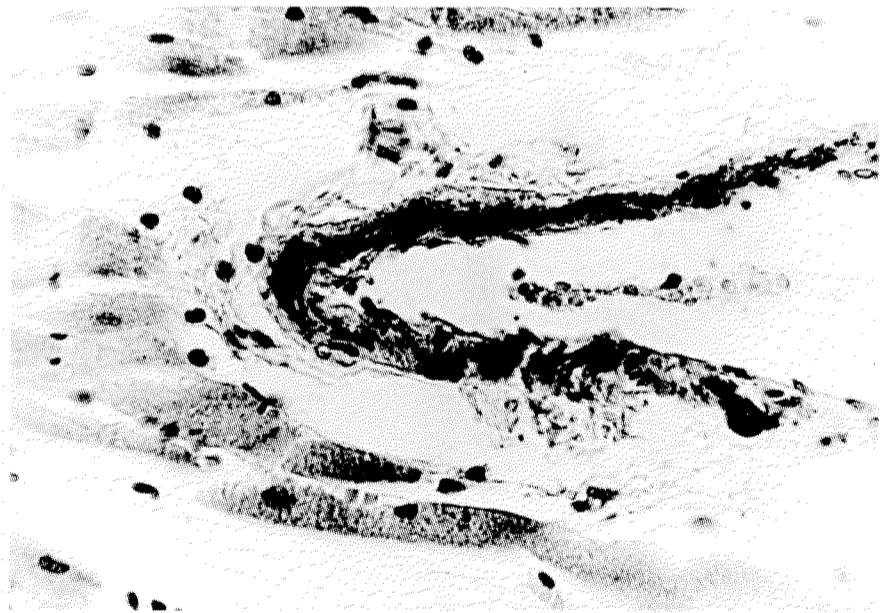


Foto 8: Corazón: pared vascular con calcificación incipiente. (Rata Nº 4).

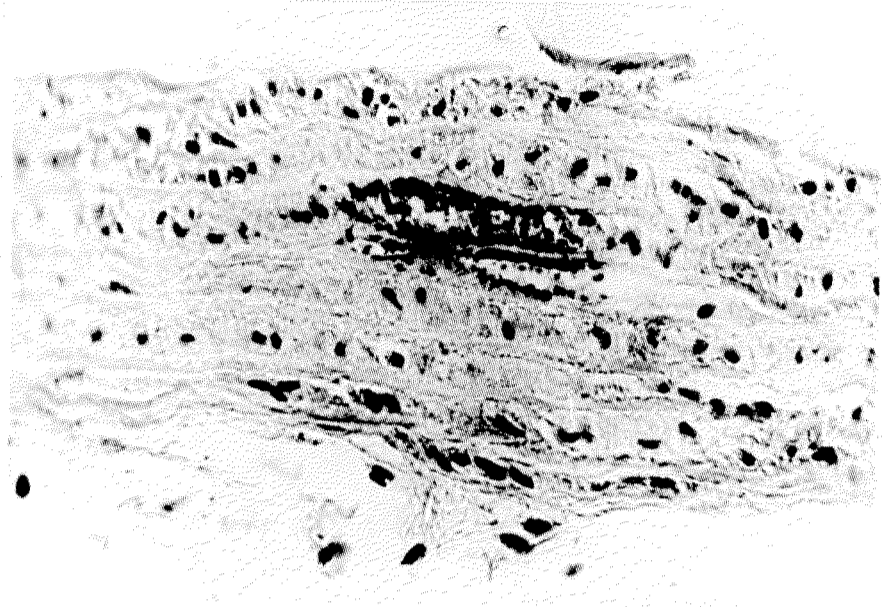


Foto 9 : Arco aórtico: granulaciones von Kossa positivas sobre dos láminas elásticas adyacentes y el espacio delimitado por las mismas. (Rata nº 4)

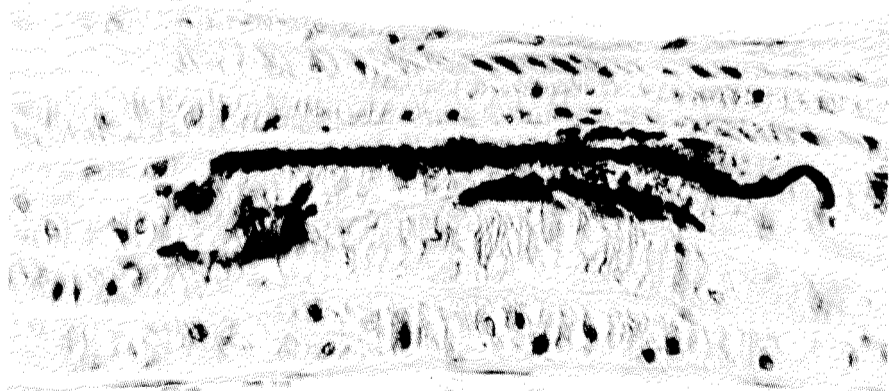


Foto nº 10 : Aorta torácica: calcificaciones de las fibras elásticas de la capa media. (Rata nº 2).

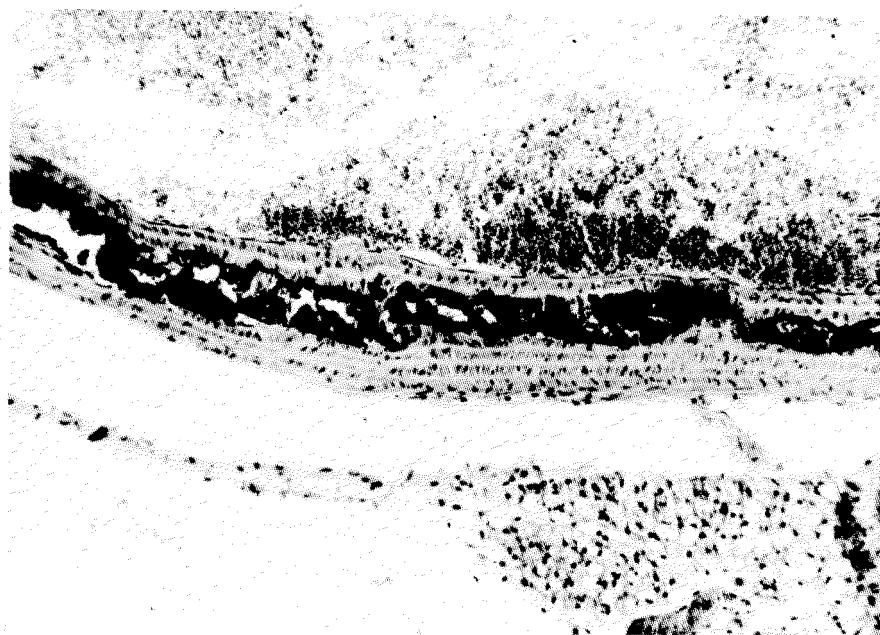


Foto 11 : Aorta torácica: banda de calcificación que se extiende a toda la circunstan-
cia del vaso. (rata nº 2)



Foto 12 : Aorta torácica: fibras elásticas total-
mente calcificadas y fragmentadas (ra-
ta nº 19).

los depósitos tienden a ser grandes, simulando una estructura cristalina, y en su gran mayoría extracelulares; localizándose en áreas de miolisis que presentan gran cantidad de elementos mononucleares, células conjuntivas y restos de fibras miocárdicas con núcleos picnóticos.

En el grupo C, el animal 19 presentó abundantes deposiciones cálcicas granulares en los vasos coronarios y similares lesiones, aunque de menor magnitud, se detectaron en la rata Nº 5 perteneciente al grupo D. Procesos de necrosis y miolisis poco significativos, se observaron en los animales 6, 13 y 14.

En los corazones de los 9 animales testigos (grupos E y F), no se encontraron focos von Kossa positivos, ni tampoco signo de degeneración o necrosis.

Aorta: se realizaron cortes histológicos de aorta torácica, abdominal y arco aórtico. Un solo animal (Nº 4) (Foto 9) acusó calcinosis aórtica tras una semana de intoxicación; todas las ratas que recibieron 14 ó más dosis (Grupos B, C, y D), estaban afectadas en mayor o menor grado.

Las calcificaciones adoptaban en principio la forma de pequeñas granulaciones depositadas sobre las fibras elásticas en la capa media. (Foto 10). En general ese proceso se inicia sobre dos láminas elásticas paralelas en zonas enfrentadas en la sustancia fundamental comprendida entre ambos focos aparecen también granulaciones von Kossa positivas, y luego resultan comprometidas otras láminas adyacentes. (Foto Nº 9). Al continuar la calcificación, se forman grandes masas que formando bandas continuas pueden extenderse a toda la circunferencia del vaso. (Foto 11). Las fibras elásticas aparecen completamente calcificadas y fragmentadas. (Foto 12).

Ningún animal de los lotes testigos (Grupos E y F), presentó lesiones de calcinosis aórtica.

Tráquea: en todos los animales sin excepción, incluyendo a los testigos, los anillos cartilagosos estaban intensamente calcificados. Consultando bibliografía especializada sobre Patología de los animales de laboratorio, comprobamos que según Cohrs y colaboradores (42) en cartílago traqueal se presenta con mucha frecuencia calcificados en conejos, ratas y ratones normales, no ocurriendo lo mismo en cobayos. En consecuencia, no puede acordársele significación a las deposiciones cálcicas de los anillos traqueales.

Estómago: En varios animales (ver Tabla Nº 8) fueron detectados focos de calcificación localizados en la región fúndica, apareciendo la porción aglandular con estructura normal. Los depósitos de calcio comienza en coincidencia con el epitelio glandular en la mitad de la mucosa, originando una considerable destrucción de elementos parenquimatosos en casos avanzados. Las capas musculares y los vasos sanguíneos pueden resultar igualmente afectados. (Foto 16)

Intestino: solamente en los animales 2 y 5, se observaron focos von Kossa positivos en el epitelio entérico, con localización preferencial en el tercio inferior de la mucosa.

Riñón: Fué uno de los órganos más afectados, mostrando calcificaciones en las células epiteliales y membranas basales tubulares. Eventualmente se observaron calcificaciones en el nvillo glomerular y cápsula de Bowman (Foto 13)

El proceso en las células de los túbulos comienza en forma de finas granulaciones intracitoplasmáticas y al ir progresando ocasiona la total calcificación y descamación

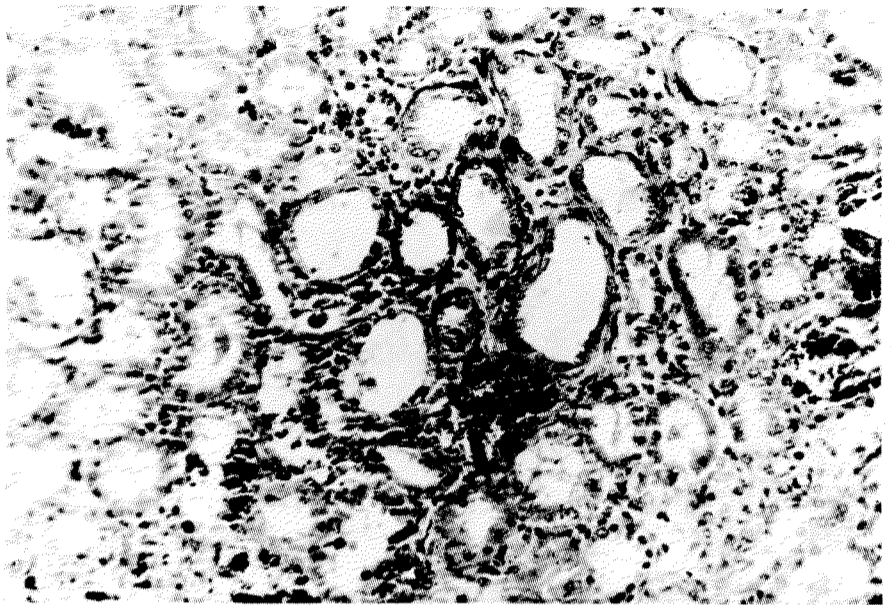


Foto 13: Riñón: Depositiones cálcicas en las células epiteliales y membranas basales de los túbulos contorneados. (Rata Nº 17).

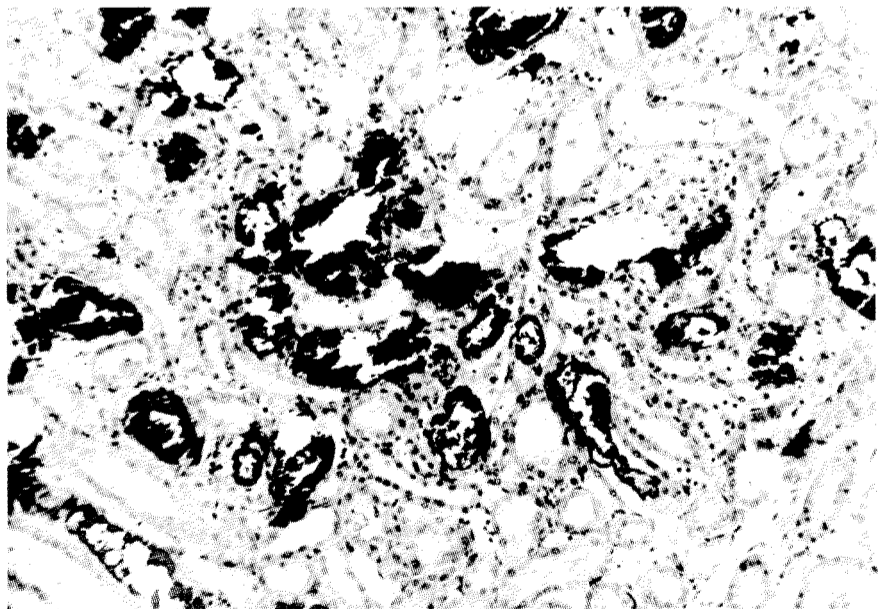


Foto 14: Riñón: Intensa nefrocalcinosis con marcada destrucción del epitelio tubular. Rata Nº 23

de esos elementos. (Fotos 14 y 15).

En siete de los nueve testigos, se observaron pequeños focos de deposición cálcica localizados en el límite entre la zona cortical y medular, lo cual obliga a interpretar con suma cautela esos cambios en los animales en experimentación. En coincidencia con estas observaciones Massee lin y colaboradores (163) informan el hallazgo de calcificaciones renales en 2/3 de los testigos, aunque de tamaño más reducido en comparación con las ratas intoxicadas con *Solanum malacoxylon*.

En la presente experiencia, se observaron intensos procesos de nefrocalcinosis como respuesta a la administración de duraznillo blanco. En todos los integrantes de los grupos A, B, C y D, las calcificaciones fueron mucho más notables en intensidad y extensión que en los grupos E y F (testigos), tal como se indica en la Tabla N° 8. Las calcificaciones se inician en la medular externa, en proximidades de la zona cortical. En una rata del Grupo A (rata N°4) y en todas las que integraron el Grupo B, se presentaban calcificaciones en las capas cortical, medular interna y externa afectando a células epiteliales y membranas basales. En los grupos C y D, el proceso era mucho más intenso, detectándose ya, en la inspección macroscópica, como se indicó anteriormente.

Pulmón: No se observaron lesiones a diferencia de lo que ocurre en rumiantes.

Adrenal: Mediante las técnicas utilizadas no fué posible detectar cambios morfológicos. No encontramos las alteraciones descritas en bovinos en la intoxicación por *Cestrum diurnum* (136).

Con la coloración de azul alcian se demostraron acú-

mulos de mucopolisacáridos en las áreas de calcificación en los distintos órganos afectados.

-oOo-

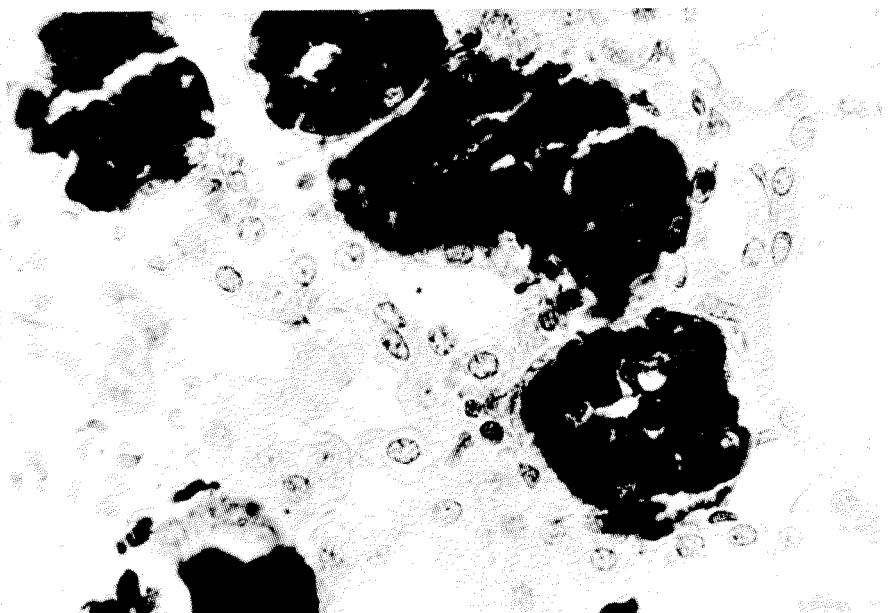


Foto 15: Riñón: Mayor aumento del corte anterior.
(Rata Nº 23).

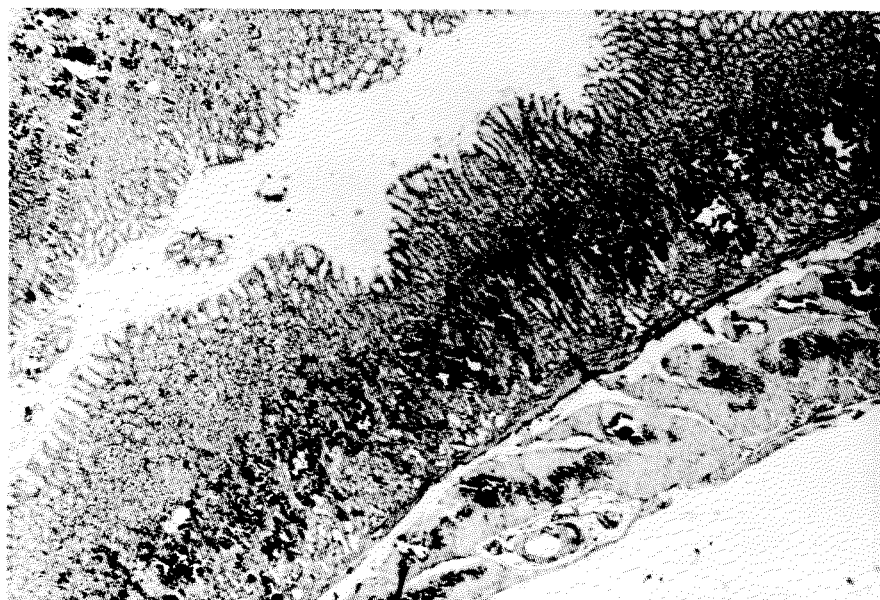


Foto 16: Estómago: Calcificaciones en el parénquima
glandular y capas musculares de la región
fúndica. Rata Nº 17.

TABLA 8 : LESIONES MICROSCOPICAS

	Rata Nº	Corazón	Aorta to cica	Aorta ab dominal	Arco aórg tico	Riñón	Estó mago	Int tin
GRUPO A (7 dosis de 500 mg)	4	++	+	-	-	++	-	-
	9	-	-	-	-	++	-	-
	21	-	-	-	-	+	-	-
	22	-	-	-	-	++	-	-
	24	-	-	-	-	+	-	-
GRUPO B (14 dosis de 500 mg)	2	+	+++	+++	+++	++	+	+
	3	++	+++	++	++	++	+	-
	15	-	-	++	**	++	-	-
	17	+	+++	+++	+++	+++	+++	-
	23	-	+	+	-	++	+	-
GRUPO C (21 dosis de 500 mg)	1	-	+++	++	+++	++	-	-
	14	-	+	+	-	++	-	-
	18	-	-	-	+	+	-	-
	19	+	+++	+++	+	+	-	-
	20	-	+++	+	+++	++	+	-
GRUPO D (28 dosis de 500 mg)	5	+	+++	+++	+++	+++	++	++
	6	-	++	+++	++	+++	+	-
	12	-	+++	+	+++	+++	++	-
	13	-	+++	++	+++	++	+	-
	16	+	+	+	++	++	+	-
GRUPO E (Testigos)	7	-	-	-	-	+	-	-
	8	-	-	-	-	+	-	-
	10	-	-	-	-	+	-	-
	11	-	-	-	-	+	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO F (Testigos)	25	-	-	-	-	+	-	-
	26	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	+	-	-
	29	-	-	-	-	+	-	-

+++ : Alto grado de calcificación

++ : Lesiones de calcificación de mediana intensidad

+ : Calcificación leve

- : Sin lesiones de calcificación

V) Conclusiones

- 1.- La administración oral repetida de extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* sin incubación previa en líquido ruminal, y en cantidad equivalente a 500 mg de hojas secas por animal y por día, provoca la aparición de síntomas y lesiones equiparables a las del Enteque ~~Se~~ co en ratas carenciadas en vitamina D.
- 2.- Los animales experimentalmente intoxicados con duraznillo blanco, presentaron anorexia y mal estado general, siendo notable la pérdida de peso corporal en comparación con los testigos.
- 3.- Algunos animales experimentalmente intoxicados con / *Solanum malacoxylon* que mostraron marcada anorexia y pérdida de peso, no presentaban lesiones de calcificación detectables por microscopía óptica.
- 4.- Los procesos de calcinosis aórtica y renal debidos a la avanzada intoxicación por *Solanum malacoxylon* en ratas, son detectables en la inspección macroscópica.
- 5.- Las calcificaciones a nivel aórtico se ordenan inicialmente siguiendo a las fibras elásticas en su recorrido.
- 6.- En algunos órganos (corazón, riñón) los depósitos calcicos iniciales son intracitoplasmáticas.
- 7.- En todos los órganos afectados, las lesiones fueron de calcificación, no observándose procesos de metaplasia conjuntiva.
- 8.- Dentro de las condiciones de esta experiencia, no se detectan calcificaciones a nivel pulmonar por microscopía óptica.

F. DISCUSION

Tal como se manifestó en la introducción (Capítulo A), se pretenden compendiar aquí los conocimientos actuales referidos a la etiología y patogenia del Enteque Seco. Ha sido reiteradamente demostrada la participación del *Solanum malacoxylon* como agente causal, mientras que otras etiologías propuestas no cuentan con pruebas experimentales. No se debe descartar empero la posibilidad de que en nuestro país existan otros vegetales con efectos calcinogénicos; al respecto resulta de interés consignar que la vulgarmente llamada avena dorada (*Trisetum flavescens*) (Ver Capítulo B, IV: Alemania), es cultivada esporádicamente en la Patagonia Occidental, donde a veces se halla adventicia (Dimitri, 1972) (57).

En los Capítulos B y D se consideró en detalle la obra de Werner Adalbert Collier (43, 44); categóricamente puede afirmarse que ese investigador demostró en 1926 la capacidad del *Solanum malacoxylon* de inducir cambios en la calcemia, lo cual le permitió postular a la intoxicación crónica con ese vegetal como etiología del "Enteque Osificante". (108)

Tanto en Patología Humana como en Patología Veterinaria, los procesos de calcificación y/u osificación de criptos en aorta, pulmones y endocardio, se consideraron desde fines del siglo pasado hasta la década del 30, como asociados a procesos infecciosos (tuberculosis, paratuberculosis, pasteurellosis crónica, etc.). Ese concepto fué indudablemente recogido por Lignieres (153, 154). Por los años 30 ya se describen corrientemente las calcificaciones metastásicas de la hipervitaminosis D; y a partir del 40 se habla de la posibilidad de carencias minerales (especialmente magnesio) que condicionen esas lesiones.-

Ese concepto fué mencionado ocasionalmente y en general no halló cabida en los tratados de Patología, o se lo menciona como simple posibilidad. Esas reservas son explicables al comprobar lo fragmentario y contradictorio de esas manifestaciones, y especialmente por no contar con sólidas pruebas experimentales perfectamente aclaradas y fácilmente verificables.

Recién en 1960(83) se vuelve a considerar la posibilidad de una intoxicación vegetal crónica en el Enteque Seco. Los investigadores de todo el mundo vuelven su atención hacia el *Sobhanum malacoxylon* gracias a las publicaciones de Carrillo y Worker en 1967 (38, 39, 268).

Collier (1926) manifiesta que los animales no ingieren el vegetal por regla general, pero sí unido a un período seco; cuarenta años después Van Cers y Worker (252) comprueban que los animales pueden consumirlo de diversas maneras; directamente, brotes tiernos u hojas caídas y mezcladas con las pasturas. Tokarnia y Döbereiner comunican en 1974 que reproducen la enfermedad en bovinos administrando 0,04 gramos/kilogramo de peso/semana de hojas desecadas durante 16 semanas. Un sencillo cálculo permite comprobar que para un bovino de 300 kilogramos de peso corporal, son necesarios solamente 12 gramos semanales. En Alemania, en donde el vegetal calcinogénico era una forrajera muy apreciada hasta no hace mucho (Ver Capítulo B, VI- Alemania; Simon, Daniel y Dirksen, 1975), pudieron comprobar la directa relación entre el *Trisetum flavescens* presente en las pasturas, y la aparición de la Calcinosis Enzoótica Bovina. En 1973 (Dirksen y colaboradores) se comunica que el *Trisetum flavescens* cultivado en una región muy alejada y de ecología completamente diferente, mantiene sus propiedades tóxicas. Se estudió exhaustivamente la relación entre los

fertilizantes y la aparición de la afección; descartan que los fertilizantes tengan un efecto directo sobre el principio tóxico (Ver Capítulo B, VI-Alemania; Plank, Hänichen y Dirksen, 1976). La así llamada "avena dorada", mantuvo sus propiedades tóxicas en terrenos con diferentes composiciones químicas.

La posibilidad de que diversas carencias minerales condicionen calcificaciones patológicas ha sido repetidamente postulada, pero también repetidamente refutada. Las discusiones sobre el particular escapan a la finalidad de esta reseña; digamos simplemente que en los últimos años los pronunciamientos a favor son cada vez más escasos. "Las guerras y tiempos de crisis de los últimos 50 años han brindado la oportunidad de estudiar en profundidad las carencias alimenticias cuali-cuantitativas de muy diversos tipos; aún hoy, según cifras de la Organización Mundial de la Salud, la mitad o las dos terceras partes de la humanidad sufre carencias de distintos tipos y grados". Ese dramático concepto es expuesto por Strohmeyer (1976) (241) en un moderno tratado de Fisiopatología (Siegenthaler) escrito en colaboración por 66 especialistas europeos; al referirse a estados carenciales minerales en humanos (P, Mg, Mn, I, Co, Cr, Zn, Fe, etc.) en ningún momento se mencionan calcificaciones patológicas.

Dentro de la Medicina Veterinaria, recientemente (septiembre de 1976), Michel (168) comunica sus estudios metabólicos representativos de 20.000 bovinos adultos en 34 departamentos de Francia; informa carencias diversas, simples o combinadas, y en su mayoría frecuentes (Mg; Zn; Mn; Co; Cu; Cu y Co; Mg y Cu; Mg, Cu y Mn; Mg, Cu, Zn y Na). Los trastornos que este autor comunica son diversos según los casos pero tampoco se mencionan deposiciones cálcicas patológicas

en ninguno de esos estados carenciales investigados.

Spiess en 1974, realiza una corta reseña sobre hiper^uvitaminosis D como parte de su trabajo de Tesis. Manifiesta que la vitamina D y el magnesio están en íntima relación. Cita la observación de varios autores (McTaggart, 170 Maston y Payne, 160; Capen y col. 29) de que la aplicación de esa vitamina en bovinos y ratas, produce una disminución del magnesio sérico. Hoy, ya en conocimiento del estrecho parentesco entre la vitamina D y las sustancias calcinogénicas vegetales descubiertas, puede comprenderse porqué frecuentemente se relacionó la calcinosis con la hipomagnesiemia.

No se ha podido demostrar en forma experimental que el Enteque Seco y otras calcinosis similares sean provocadas por estados carenciales y/o desequilibrios en la relación suelo/planta, en condiciones perfectamente definidas y explicadas para que otros investigadores puedan corroborar o refutar esos hallazgos. Por el contrario se han probado los efectos del *Solanum malacoxylon* en todo el mundo. (Ver Capítulo D) y por muchos investigadores, se ha demostrado la composición química del principio activo (Haussler y colaboradores, 115) y es incuestionable que el 1,25 dihidroxicalciferol presente en el duraznillo, produce un aumento de la absorción intestinal de calcio y fósforo, y la instauración de calcificaciones metastásicas.

El principio activo del *Solanum malacoxylon*: 1,25 dihidroxicolecalciferol se encuentra unido a un glicósido de composición aún no determinada, y la efectividad biológica correspondiente se presenta en toda su potencia después de someter al vegetal a la acción de una mezcla de glicosidasas (115). Esto explica los hallazgos de Carrillo (32): el

Solanum malacoxylon previamente incubado en líquido ruminal presenta un poder calcinogénico mucho mayor. No obstante, y según se manifestó anteriormente, el duraznillo blanco es igualmente activo sin haber sufrido la acción enzimática del contenido ruminal. Menos activo resulta el vegetal administrado por vía parenteral (166, 141, 137, 138).

Una vez liberada la 1,25 dihidroxivitamina D_3 en el rumen se localizaría en los receptores cromáticos de las células intestinales, codificando la síntesis de un ARN mensajero, el cual a su vez determina una producción aumentada de proteína de conjugación del calcio (CaBP). La absorción intestinal de calcio resulta de esa manera aumentada. El $1,25(OH)_2D_3$ estimula igualmente la transferencia de fosfatos a través de las paredes intestinales en un proceso independiente del anterior.

Esos efectos a nivel intestinal están bien demostrados y alcanzan para explicar el proceso de calcificación metastásica. Pero ocurre también que la concentración plasmática de $1,25(OH)_2D_3$ aparece "dramáticamente incrementada" (al decir de Peterlik y col. 204) después de administrar Solanum malacoxylon. Y los efectos biológicos y mecanismos de acción de la referida hormona distan mucho de ser completamente conocidos; así por ejemplo, según se dijo en el Capítulo C, se acepta que el $1,25(OH)_2D_3$ promueve la resorción de calcio y fósforo a nivel óseo. Igualmente parece actuar el Solanum malacoxylon "in vivo" (166, 28, 118, 256, 11) o "in vitro" (116, 256); no obstante los resultados son contradictorios y algunos autores manifiestan que el Solanum malacoxylon no provoca resorción de calcio óseo "in vivo" (249 ni tampoco "in vitro" (172). Las lesiones raquílicas producidas experimentalmente en ratas se curan por la administra-

ción oral de *Solanum malacoxylon* (140, 133) y los distintos estudios histológicos coinciden en señalar un aumento de la densidad ósea. Carrillo (34) denomina al proceso como osteoesclerosis y demuestra la aposición de tejido óseo de reciente formación en animales experimentalmente intoxicados; Dämmrich y Döbereiner (52, 75) señalan mielofibrosis, hiperostosis y formación de sustancia fundamental anormal; finalmente Dos Santos y col. (79) encuentra una inhibición de la osteolisis osteocítica en conejo 12 horas después de administrar *Solanum malacoxylon*, considerando que se trata de un efecto directo no mediado por la calcitonina o la hormona paratiroidea.

Sin duda las investigaciones futuras se ocuparán del problema en profundidad, relacionando los efectos simultáneos o individuales de la hormona D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), parathormona y calcitonina a nivel del tejido óseo.

Los cambios descritos en tiroides y paratiroides (33, 46) se consideran secundarios a la hipercalcemia. Sin embargo, recientes estudios parecían indicar que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bajaría los niveles de hormona paratiroidea circulante inhibiendo directamente la secreción de la misma tanto "in vivo" como "in vitro" (41). No debe olvidarse tampoco que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ también muestra efectos directos en riñón y músculo (capítulo D). Los factores involucrados en la intoxicación por *Solanum malacoxylon* como se ve son varios; si a ello agregamos las características peculiares a cada especie animal, la composición de la alimentación y las posibles variaciones en cuanto a dosis y vías de administración, es lógico que existan resultados contradictorios.

En lo que se refiere a las calcificaciones de los tejidos blandos, existen al parecer diferencias de espe-

cie muy llamativas. Por ejemplo la falta de calcificaciones aórticas en cerdos intoxicados con *Solanum malacoxylon* y que presentaban lesiones óseas características.(78) Más llamativa aun es la falta de calcificaciones pulmonares en ratas por efecto del *Solanum malacoxylon*, siendo este un proceso muy frecuente en ruminantes; e incluso en ratas dosificadas con dihidrotaquisterol (209).

En cuanto a la génesis de las típicas deposiciones de la calcificación metastática en los tejidos blandos, tradicionalmente se han atribuido a la precipitación de fosfato de calcio en áreas donde se rebasó el producto de solubilidad, pudiendo ser la acidosis un factor contribuyente; aunque esa explicación "parece pecar por un exceso de simplificación"(20); otros autores le acuerdan importancia a una alcalinidad de determinados tejidos (222).

Existe una afinidad especial de las fibras elásticas por los iones calcio (250). Determinados cambios en los mucopolisacáridos ácidos en la media aórtica provocarían sitios calcioafines en la elastina. La corriente de iones calcio incrementada se sabe que produce un aumento de la densidad de la sustancia fundamental, lo cual limita la difusión de elementos nutritivos de alto peso molecular necesarios para la capa media arterial (114). Con ello aumentaría la síntesis de mucopolisacáridos en la media y la fracción de iones calcio combinados con fosfatos; la calcificación se realizaría a lo largo de las fibras elásticas que servirían como matriz. Esta interesante concepción teórica fue expresada por Walf (266).

La especial afinidad por el calcio de las fibras elásticas en las calcificaciones metastáticas es bien conocida, al igual que el aumento de mucopolisacáridos en esos procesos. No obstante, esa diferente afinidad tis-

lar según la especie, induce a pensar que seguramente hay otros factores involucrados en esas calcificaciones. Igualmente llamativa es la no presentación de procesos de metaplasia conjuntiva en ratas y que se encuentran con mucha frecuencia en ruminantes; en el segundo caso las calcificaciones han evolucionado durante largos períodos, lo que no ocurre con los animales de laboratorio intoxicados experimentalmente. Ese hecho podría explicar la diferencia apuntada.

La presencia de focos von Kossa positivos intracito plasmáticos (ver capítulo E), está indicando otro tipo de calcificación. Cuando ello ocurre en el epitelio de los / túbulos renales, podemos pensar en una filtración y resorción de calcio y fósforo aumentadas, ya que ambos elementos son activamente absorbidos a nivel de los tubos con-- torneados proximales (85). Algunos autores opinan que las calcificaciones renales metastáticas se deben a la resorción de mucoproteínas, las que servirían de base para la deposición de sales cálcicas en el citoplasma (122). Re-- cuérdese asimismo que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorece la resor -- ción de calcio, según se manifestara anteriormente (capí-- tulo C).

Scarpelli (228) estudia la nefrocalcinosis experi-- mental por hipervitaminosis D en ratas. Demuestra alteraciones bioquímicas en las mitocondrias del epitelio tubu-- lar antes de la aparición de calcificaciones, y que básicamente indicarían una depresión de la fosforilación oxi-- dativa de otros autores, cuestiona el clásico concepto de calcificación metastática elaborado por Virchow (253) que habla de calcio depositado en tejidos previamente intac-- tos.

Se han descripto otras calcificaciones intramitocon

driales en el hiperparatiroidismo experimental (20) y en la intoxicación crónica con dihidrotaquisterol (209) Siendo el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ la forma metabólica activa de la vitamina D_3 , es muy lógico suponer que ese compromiso de la fosforilación oxidativa por efecto de la hipervitaminosis D también ocurre en el Enteque Seco. Más allá del problema didáctico de considerar al proceso como de calcificación distrófica o metastática, surge toda una serie de posibles implicancias. Estará a ese nivel la causa de la marcada pérdida de peso que acusan los animales dosificados con *Solanum malacoxylon*?

Las deposiciones cálcicas aórticas en bovinos son un hallazgo muy frecuente en nuestro país; ya en 1926 Collier habla de animales sanos, pero que a la necropsia "se reconocen como enfermos" (43, 44). Antes de la deposición de sales cálcicas detectables por microscopía óptica, ya hay anorexia y pérdida de peso (capítulo E), ocurre lo mismo con nuestros vacunos a campo?, todo parece indicar que sí. Las nefastas implicancias del *Solanum malacoxylon* sobre nuestra economía pecuaria escaparían a todo cálculo.

. . . .

G. RESUMEN

El presente trabajo incluye una amplia revisión bibliográfica referida al Enteque Seco y otras calcinosis espontáneas de los herbívoros. Las investigaciones / realizadas con *Solanum malacoxylon* en distintas partes / del mundo son igualmente consideradas. Se ha pretendido brindar así una actualización del problema; y paralela-- mente, ofrecer una guía para quienes en el futuro inves-- tigen sobre el tema.

El capítulo C consta de un resumen referido al metabolismo y significación de la vitamina D, según los conocimientos actuales.

La administración oral repetida de un extracto acuoso de *Solanum malacoxylon* a ratas carenciadas en vitamina D, produjo intensa pérdida de peso y la aparición de calcificaciones metastáticas. Se describen los hallazgos macro y microscópicos. En el capítulo F se hacen diversas consideraciones referidas a la etiología y patogenia del Enteque Seco.

SUMMARY

This work include a large bibliographic revisión about "Enteque Seco" and other calcinosis in herbivorous.- The researches made with *Solanum malacoxylon* in anothe // countries are also considered.

The purpose of this work, besides of trying to pout up ot date this problem, is to offer a guide to those who will work in the future on this particular field.

The chapter C consist of a summary about metabolism and importance of vitamin D according to the present know

ledges.

Dosis of Solanum malacoxylon aqueous extract repeatedly administred, provoked a marked lost of weight and metastatic calcifications appear.

Macro and microscopic finding are also described.

Etiology and pathogenie of Enteque Seco are considered in the chapter F.

.

H. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ALBARENGA GAONA J.C.: 1964. (Citado por Ruager, 1964).
- 2.- ARNOLD R.M.: "Manchester Wasting Disease. A Disease of Ruminants Manifested by Metastatic Calcification Especially of the Cardio-Vascular System". West Indian med.J., 3(1954):1-8.
- 3.- ARNOLD R.M.: "La maladie épuisante de Manchester chez les ruminants de la Jamaïque". Bull. Intern. des Epizoot., 46(1956):217-231.
- 4.- ARNOLD R.M.: "The interaction of Calcium, Magnesium, Phosphorus, other Minerals and Vitamin D in the Aetiology of Manchester Wasting Disease". Tropical An. Health and Proc. 1(1969):75-84.
- 5.- ARNOLD R.M. and Fincham I.H.: "Cardiovascular and Pulmonary Calcification Apparently Associated with Dietary Imbalance in Jamaica". J.Comp.Pathol., 60(1950) 51-66.
- 6.- ARNOLD R.M. and Brass G.: "Observations on the morbid anatomy and histology of Manchester Wasting Disease and related conditions in other Countries of America". Amer. J. of Vet. Res. 65 (1956):630-639.
- 7.- BARROS, S. de Santiago C.: "Calcificação sistêmica en zóotica em ovinos". Anais VII e VIII Conf. Soc. Vet. Rio Grande do Sul, Porto Alegre (1968/69), p. 1 (Resumo).
- 8.- BARROS, S. de; Pohlenz, J. und Santiago C.: "Zur Kalzinose beim Schafe". Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77 (1970):346-349.
- 9.- BASSUDDE, C.D.K. and Humphreys D.J.: "The Effect of the Active Principle of Solanum malacoxylon on Rabbits and the Inhibition of its action by Actinomycin D". Calcif.Tiss.Res. 18(1975);133-139.
- 10.- BASUDDE C.D.K. and Humphreys D.J.: "The effect of the administration of Solanum malacoxylon on the chick". Res. in Veter. Sc. 18(1975):330-331.
- 11.- BASUDDE C.D.K. and Humphreys D.J.: "The vitamin D₃ metabolite-type activity of Solanum malacoxylon". Clin. Endocrinology 5 (1976):109-118, Suppl.
- 12.- BELLAGAMBA C.A.; Rodriguez Gonzalez M. y Sans A.: "Aorta osificada en vacuno. Registro de un nuevo caso". Rev. Fac. C. Vet. La Plata 6, Nº 15(1964):171-173.
- 13.- SINGLEY J.B.: "Enteque Seco, perspectivas bioquímicas". Bol.Téc. Nº 29(1964), Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA.

- 14.- WINGLEY, J.B.; Landó, E.R. y Carrillo B.J.: "Enteque Seco. Aspectos bioquímicos. II.-Niveles de fósforo en sangre de bovinos en áreas afectadas". Bol. Tecn. N° 39(1965). Est. Exper. Agrop. Balcarce, INTA; y Rev. Inv. Agrop., INTA, S.4, P.A., II, 15(1965):207-220.
- 15.- BOLAND R.L.; Skliar M.I.; Boland A.R. de; Carrillo B. J. y Ruksan B.E.: "Modificación del principio activo del Solanum malacoxylon mediante incubación con líquido ruminal". Medicina(Bs.Aires), 36(1976):323-329.
- 16.- BOLAÑO A. y Culot J.Ph.- Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA, 1965. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 17.- BOWES N.D.: "Calcificaciones múltiples en los animales domésticos en la Argentina". Proc. 16 Int. Vet. Congr., Madrid, 2(1959):109. Resumen: The Vet. Bull. 30(1960).
- 18.- BOWES N.D. y Griot C.: "Enteque Seco". Ciencia y Ganadería (Inst. Rosenbuch) 37 (1959):5.
- 19.- BRUNNER F.: "Mineral-und Nährstoffgehalt des Heus süd württembergischer Wiesen und deren botanische Zusammensetzung". Z. Acker- u. Pflbau. 90 (1950):306-349. (Citado por Simon y col., 1975).
- 20.- BRUNSON, J.G. y Gall, E.A.: "Tratado de Patología Humana". Edit. Interamericana, México, 1975.
- 21.- BULMAN G.M.: "Guata-i, forma correntina del Enteque Seco". Provección Rural 2, N- 25 (1970):32-33.
- 22.- CABRERA A.L.: "Flora de la Provincia de Buenos Aires" T.1:209, Colección Científica del INTA, Bs.Aires, 1965. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 23.- CAMBEROS H.R.: "Arterioesclerosis calcificante en ruminantes: Enteque Seco". Gaceta Veterinaria, 33:249 120-128. (1971).
- 24.- CAMBEROS H.R.; Davis G.K.; Djafar M.I. and Simpson, C. F.: "Soft Tissue Calcification in Guinea Pigs". Florida Ac. of Science, Deland, Florida, marzo de 1968 y Am. J. Vet. Res., 31:685-696. (1968).
- 25.- CAMBEROS H.R. y Davis G.K.: Conf. en la 2da. Reunión Latin. de San. Animal, Lima, Peru, 1968.
- 26.- CAMBEROS H.R.; Djafar M.I. y Davis G.K.: "Experimental Cardiovascular Calcification in Sheep produced by Solanum malacoxylon". Florida Ac. of Science, Gainesville, Florida, marzo 1969.
- 27.- CAMBEROS H.R. y Davis G.K.: "Acción del Solanum malacoxylon sobre el balance mineral en ovinos". Gaceta Veterinaria, 32:466. (1970).; y A.E.P.A. Mem. 3 (1969):31-39.

- 28.- CAMPOS, C.; Ladizesky M. and Mautalen C.: "Effect of Solanum malacoxylon on the Serum Levels of Calcium and Phosphate in Thyroparathyroidectomized and Rachitic Rats". Calc. Tiss. Res. 13:245-248. (1973).
- 29.- CAPEN, Ch.; Cole C. and Hibbs, J.: "The Pathology of Hypervitaminosis D in Cattle". Pathol. Vet. 3:350-378. (1966).
- 30.- CARRAZZONI J.A.: "Ganadería Subtropical Argentina". Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur, 1974.
- 31.- CARRILLO B.J.: "The Pathology of Enteque Seco and Experimental Solanum malacoxylon Toxicity". Ph.D. Thesis, Davis, University of California, 1971.
- 32.- CARRILLO B.J.: "Intoxicación experimental en ratas con Solanum malacoxylon". Medicina 31:604 (1971).
- 33.- CARRILLO B.J.: "Efecto de la intoxicación de Solanum malacoxylon en la morfología de las células parafoliculares de la tiroides". Rev.Inv.Agrop., INTA, S. 4, P.A., X, 1(1973):41-54.
- 34.- CARRILLO B.J.: "Efecto de la intoxicación de Solanum malacoxylon en el sistema óseo". Rev.Inv.Agrop., INTA, S.4, P.A., X, 2:65-77 (1973).
- 35.- CARRILLO B.J.; Landón E.; Kennedy, P.C. y Gaggino, O.P.: "Efectos bioquímicos y patológicos de dosis masivas de Vitamina D en bovinos". Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA, 1963. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 36.- CARRILLO B.J.; Gaggino O.P.; Ruksan B.E.; Landó E.; Deshpande P.D.; Tilley, J.M.A. y Worker N.A.: "Reproducción experimental de Enteque Seco en bovinos dosificados con extracto acuoso de Solanum malacoxylon". Simp. sobre Enteque Seco. Bol.Tecn.Nº 54, (1967), Est. Exp. Agrop., Balcarce, 1967.
- 37.- CARRILLO B.J. y Worker N.A.: "Enteque Seco: consideraciones generales". Simp. sobre Enteque Seco, Boletín Técn. Nº 54(1967), Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA.
- 38.- CARRILLO B.J. y Worker N.A.: "Enteque Seco: arterioesclerosis y calcificación metastásica de origen tóxico en animales a pastoreo". Rev. Inv. Agro., INTA, S.4, P.A., IV, 2:9-30. (1967).
- 39.- CARRILLO B.J. y Worker N.A.: "Enteque Seco: arterioesclerosis y calcificación metastásica de origen tóxico en animales a pastoreo". Actas del Congr. de Prod. Anim., Buenos Aires, 2:101-110. (1967).
- 40.- CARRILLO B.J.; Tilley J.M.; Garcés N.E.; Gaggino O. P.; Ruksan B.E. y Worker N.A.: "Intoxicación experimental de bovinos con Solanum malacoxylon". Gac. Vet. 33(255):468-484, (1971).

- 41.- COHN D.V. and Hamilton J.W.: "Newer Aspects of Parathyroid Chemistry and Physiology". The Cornell Veterinarian, 66:271-300. (1976).
- 42.- COHRS P.; Jaffé R. und Meessen H.: "Pathologie der Laboratoriumstiere". Springer Verlag. Berlin-Göttinger-Heidelberg, 1958.
- 43.- COLLIER W.A.: "Contribución al conocimiento de la enfermedad de los bovinos conocida con el nombre de Enteque". Folleto del Ministerio de Agric. de la Nación, Buenos Aires, noviembre de 1926.
- 44.- COLLIER W.A.: "Zur Kenntnis einer als Enteque bezeichneten Krankheit der Rinder in der Provinz Buenos Aires". Z.für Infektionskrankheiten 31(2):81-92. (1927).
- 45.- COLLINS D.H.: "Pathology of Bone". Butterworths, London, 1966. (Citado por Carrillo, 1973).
- 46.- COLLINS W.T.; Capen, C.C. and Döbereiner J.: "Ultrastructural Evaluation of Parathyroids Glands and Thyroid C-cells from Cattle Fed Solanum malacoxylon". 34 th. Anj. Proc. Electr. Micr. Soc. Amer., Miami Beach, Florida, Bailey (ed), 1976.
- 47.- COPLAND J.W.: "Enzootic calcosinosis of cattle in Papua New Guinea". Australian Vet. J. 51:326 (1975).
- 48.- CORRADINO R.A. and Wasserman R.H.: "1,25-dihydroxy-cholecalciferol-like activity of Solanum malacoxylon extract in calcium transport". Nature, 252: 716-718. (1974).
- 49.- CUERPO L. y Casal J.J.: "Valores en suero bovino de ácido siálico. Comparación entre bovinos aparentemente normales y con Enteque Seco". Rev. Inv. Agrop., INTA, S. 4, P.A., II, 7:85. (1965).
- 50.- CHINEME Ch. N.; Krook L. and Pond W.G.: "Bone Pathology in Hypervitaminosis D and Experimental Study in young pigs". The Cornell Vet. 66:387-412. (1976)
- 51.- DAMMRICH K.; Dirksen G. und Plank P.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 3. Skelettveränderungen". Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77:343-346. (1970).
- 52.- DAMMRICH K.; Döbereiner J.; Done S. und Tokarnia C.: "Skelettveränderungen nach Vergiftung mit Solanum malacoxylon bei Rindern". Zbl. Vet. A, 22:313-329 (1975).
- 53.- D'ARCY W.G.: "Solanum and its close relatives in Florida". Ann. Missouri Botanical Garden 61:819-867. (1974). (Citado por Peterlik y col., 1976).
- 54.- DAVIS G.K.; Camberos H.R. and Djafar M.I.: "Nutritionally Induced Soft Tissue Calcification". Fed. Meet. Ac. of Sc., Atlantic City, 1968. (Citado por Köhler y col., 1970).

- 55.- DE LUCA H.F.: "Neu Erkenntnisse über den Vitamin-D-Stoffwechsel". *Trangel (Sandoz)* 12(3):111-118, (1974)
- 56.- DE LUCA H.F. and Schnoes H.K.: "Metabolism and Mechanism of Action of Vitamin D". *Annual Review of Bio.* 45:631-666 (1976).
- 57.- DIMITRI M.J.: "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería". Buenos Aires, Editorial Acme S.A.C.I. 1972.
- 58.- DIRKSEN G.: "Neuere Beobachtungen auf dem Gebiet der Stoffwechselstörungen der Hochleistungskuh". In: *Ta- gungsbericht der Schaumann-Stiftung zur Förderung der Agrarwissenschaften, 55/64, 1969.*
- 59.- DIRKSEN G.; Plank P.; Spiess A.; Hänichen T. und Dämmrich K.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77:321-338, (1970).
- 60.- DIRKSEN G.; Plank P.; Hänichen T.; Dämmrich K. und Spiess A.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 4. Untersuchungen an Schafen mit selektiver Verfütterung von Klee, Gräser oder Kräuter". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 78:1-24 (1971).
- 61.- DIRKSEN G.; Plank P.; Dämmrich K. und Hänichen T.: "Das klinische und pathologisch-anatomische Bild einer enzootische Kalzinose beim Rind". *Veterinar-Medizinische Nachrichten* 2/3:199-214, (1971).
- 62.- DIRKSEN G.; Plank P.; Dämmrich K. und Hänichen T.: "The Clinical and Pathological-Anatomical Features of an Enzootic Calcinosis in Cattle". *Veterinary Medical Review*, 2/3:207-222. (1971).
- 63.- DIRKSEN G.; Plank; Dämmrich K. und Hänichen T.: "Cuadro clínico y anatómopatológico de una calcinosis enzootica en el bovino". *Noticias Médico-Veterinarias* 2/3:203-218 (1971).
- 64.- DIRKSEN G.; Plank P.; Dämmrich K. und Hänichen T.: "Tableau clinique et anatomo-pathologique d'une calcinose enzootique des bovins". *Informations de Médecine Vétérinaire* 2/3:195-210, (1971).
- 65.- DIRKSEN G.; Plank P.; Hänichen T. und Spiess A.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 5. Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knautgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und eine Grässergemisch. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 79:73-96, (1972).
- 66.- DIRKSEN G.; Plank P.; Hänichen T. und Spiess A.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 6. Experimentelle Kalzinose bei Kaninchen durch selektive Verfütterung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*)". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 80:145-172, (1973).

- 67.- DIRKSEN G.; Plank P.; Hänichen T. und Spiess A.: "Die enzootische Kalzinose. Eine neue Weidekrankheit des Rindes". Rundschau, 25:146-148 (1973).
- 68.- DIRKSEN G.; Plank P.; Hänichen T. and Simon U.: "Experimental Investigations on the Etiology of an Enzootic Calcinosis in Cattle". Vit.D and Probl. to Uremic Bone Dis., Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York, 1974.
- 69.- DIRKSEN G.; Plank P.; Simon U.; Hänichen T.; Daniel P. und Spiess A.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 7. Nachweis der kalzinogenen Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens* (L) P.B.)". Dtsch. Tierärztl. Wschr., 81:1-28 (1974).
- 70.- DIRKSEN G.; Simon U.; Plank P.; Hänichen T.; Daniel P. und Spiess A.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 8. Untersuchungen über die mögliche Bedeutung des Sonnenlichtes (UV-Strahlen) bei der Entstehung der Kalzinose sowie der kalzinogenen Wirkung von getrockneten Golhafer (*Trisetum flavescens* (L))". Dtsch. Tierärztl. Wschr., 82:385-428, (1975).
- 71.- DIRKSEN G. und Plank P.: "Der Goldhafer lässt die Rinder verkalken". Bayerisches Landwirtschaftl. Wochenbl., 48:16-17, (1975).
- 72.- DJAFAR M.I. and Davis G.K. - 1972. (Citado por Humphreys 1973).
- 73.- DÖBEREINER J.: Comunicación personal, enero de 1977.
- 74.- DÖBEREINER J.; Tokarnia C.; Despacho da Costa J.B.; Eubank Campos J.L. e Souza Dayrell M.: "Espichamento, Intoxicação de Bovinos por *Solanum malacoxylon* no Pantanal de Matto Grosso". Pesq. Agrop. Bras., Sér. Vet. 6:91-117, (1971).
- 75.- DÖBEREINER J. und Dämmrich K.: "Skelettveränderungen bei Rindern nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* Sendtner". Verh. Dtsch. Ges. Path., 58:323-326, (1974).
- 76.- DÖBEREINER J.; Done S. and Beltran L.: "Experimental *Solanum malacoxylon* poisoning in calves". Br. vet. J., 131:175-185, (1975).
- 77.- DONE S.H.; Döbereiner J. and Tokarnia C.H.: "Systemic connective tissue calcification in cattle poisoned by *Solanum malacoxylon*: a histological study". Brit. vet. J., 132:28-38, (1976).
- 78.- DONE S.H.; Tokarnia C.H.; Dämmrich K. and Döbereiner: "*Solanum malacoxylon* poisoning in pigs". Res. in Vet. Sci. 20:217-219, (1976).
- 79.- DOS SANTOS M.N.; Nunes V.A.; Nunes I.J.; De Barros S. S.; Casserman R.H. and Crook L.: "*Solanum malacoxylon* Toxicity: Inhibition of Bone Resorption". The Cornell Vet., 66:565-588, (1976).

- 80.- DOZO M.F.; Malianci F.S. y Stura C.: "Enteque Seco". Rev.Fac. C. Vet. La Plata, 5(13):107-120. (1963). (Resumen en: The Vet. Bull., 34(1964)).
- 81.- ECKELL O.A.: "Acción tóxica del Solanum glaucum Dun. (duraznillo blanco)". An. Fac. Med. Vet. La Plata, 5:9-91, (1942). (Res.en:The Vet. Bull.,14:394(1944)).
- 82.- ECKELL O.A.: "Acción tóxica del Solanum glaucum Dun. (duraznillo blanco)". Rev. Militar de Veter., 25:453 (1943).
- 83.- ECKELL O.A.; Gallo G.G.; Martin A.A. y Portela R.A.: "Observaciones sobre el Enteque Seco de los bovinos" Rev. Fac. C.Vet. La Plata, 2(6):193-211. (1960).
- 84.- ECHAVARREN A. -1975.(Citado por Riet Correa y col., 1975).
- 85.- EIGLER J.; Buchborn E. und Deetjen P.: "Niere und ableitende Harnwege".In:Siegenthaler, W.u.a.;"Klinische Pathophysiologie", 3ª Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.
- 86.- FIRST WEST INDIAN VET. CONF., Proceeding, Kingston: Govt.Printer(1947): 7.(Resumen en: The Vet. Bull.20 256 (1950).
- 87.- FORGEOT P.: "Traité des Maladies Infectieuses et Contagieuses d'Origine Microbienne des Animaux Domestiques". Les Publications Johanet, Paris, 1935.
- 88.- FRONTERA A.R.; Garcés E.N.; Arnhold J.J.; Stevenson A.E. y Tilley J.M.A.: 7mo.Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires (Rep. Argentina), 1966.
- 89.- FRONTERA A.R.; Garcés E.N.; Stevenson A.E. y Tilley J.M.A.: "Composición mineral de pasturas productoras de Enteque Seco". Simp. sobre Enteque Seco, Col. Técn. Nº 54, Est. Exp. Agrop., Balcarce (1967), Balcarce, República Argentina.
- 90.- GAGGINO O.P.: "Desarrollo de la lesión arteriosclerótica incipiente en el Enteque Seco reproducido experimentalmente en ovejas". Rev. Inv. Agrop., S.4, 6(3):31-40(1969). P.A.
- 91.- GAGGINO O.P. y Carrillo B.J.: "Enteque Seco.I.Observación de lesiones de tipo paratuberculosis en bovinos con Enteque Seco". Rev. Inv. Ganad., INTA, 16: 39, (1963).
- 92.- GAGGINO O.P. y Carrillo B.J.: "Enteque Seco.II.Resultados de pruebas intradérmicas dobles con tuberculina bovina y aviar en bovinos de zonas de Enteque Seco, en el sudeste de la Pcia. de Buenos Aires". Rev. Inv. Agrop., INTA, S.4, P.A., 1(7):67. (1964).

- 93.- GAGGINO O.F.; Deshpande P.D. y Tilley J.M.: "Reproducción experimental de lesiones arterioscleróticas del Enteque Seco en ratas". Rev. Inv. Agrop., INTA, S.4, P.A., 4(9):123-128 (1967).
- 94.- GAILIUNAS P. - J.Amer. vet. med. Ass., 132:533 (1958)
- 95.- GALOFRE E.J.: "Tratamiento y prevención del enteque seco". Proyección rural, 3(33). 1970.
- 96.- GALOFRE E.J.: "El enteque seco. Causas y curación". La Hacienda (Méjico), 66:6. (1971).
- 97.- GALOFRE E.J. e Iseas F.: "Enteque Seco y Enteque Parasitario". Rev. Med. Vet., 51(6):471-474 (1970).
- 98.- GALLO G.G.; Paoli A.R.J.; Galofré E.J.; Torres Moreno A.; Iseas F. y Pereyra H.: "Tratamiento del Enteque Seco en bovinos con ficoloides quelatados aplicados parenteralmente". Rev. Med. Vet., 51(6): 3-12 (1970).
- 99.- GALLO G.G.; Paoli A.R.J.; Galofré E.J.; Torres Moreno A.; Iseas F. y Pereyra H.: "Alentadora experiencia en el tratamiento del enteque seco". Proyección Rural 4:38 (1971).
- 100.- GALLO G.G.; Iseas F.; Noseda R.P.; Finochietto H.D.; Cumba S.A. e Inchausti A.: "Actualización de Plantas Tóxicas en la República Argentina". Cátedra de Patología Médica, Fac. C. Vet., Univ. Nac. de La Plata. Prov. Buenos Aires (Rep. Argentina), 1973.
- 101.- GARCÉS N.E.; López T. y Tilley J.M.A.: "Técnica de extracción y pruebas biológicas del extracto acuoso de S. malacoxylon". Informe Téc. FAO-INTA, Est. Exp. Agrop., Balcarce, INTA, 1966.
- 102.- GARCÉS N.E. y Tilley J.M.A.: 7mo. Congr. Panamer. de Farm. y Bioq., Buenos Aires, 1966.
- 103.- GARCÉS N.E.; Okada A.K.; Landó E.; Ruksan B.E.; Cullot J.Ph.; Tilley J.M.A.; Deshpande P.D. y Roberts R.M.: "Efecto del Solanum malacoxylon sobre el calcio y fósforo inorgánico en sangre de bovinos". Simp. sobre Enteque Seco, Bol. Téc. N° 54 (1967) Est. Exp. Agrop. INTA, Balcarce; y 7mo. Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, 1966.
- 104.- GERDAUER P.: "Accelerated ageing in cattle". Hawaii Med. J., 24:446-452. (1965).
- 105.- GILL S.S.; Singh G.; Malkiat and Chpra A.K.: "Enzootic Calcinosis in Sheep: Clinical Signs and Pathology". Amer. J. Vet. Res., 37:545-552. (1976).
- 106.- GIMENO E.J.: "Sobre las Calcinosis Generalizadas de los Animales domésticos". Gaceta Veterinaria, 39 (317):10-17, (1977).

- 107.- GIMENO E.J.: "Enteque Seco.Consideraciones etiopatogénicas". Rev.de Med. Vet., 58(2):149-161. (1977)
- 108.- GIMENO E.J.: "Estudios sobre Enteque Seco.Algunas consideraciones históricas". Gac. Vet., 39(322):382-388. (1977).
- 109.- GREECH G.T. - Amer. J. Vet. Res., 2:400. (1941).
- 110.- HAAS H.G.: "Calciumhormone.Parathorm, D-Hormon und Calcitonin(einschl. zusammenspiel mit anderen Hormonen)". In: Siegenthaler, W.u.a.; "Klinische Pathophysiologie", 3^o Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1976.
- 112.- HÄNICHEN T.; Plank P. und Dirksen G.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.2.Histomorphologische Befunde an den Weichgeweben". Dtsch. Tierärztl. Wschr., 77:338-343. (1970).
- 112.- HÄNICHEN T.; Dirksen G.; Plank P. und Spiess, A.: "Morphologische Befunde bei experimenteller Kalzinose". Berl. und Münch. Tierärztl. Wschr., 85:397-399. (1972).
- 113.- HÄNICHEN T.; Dirksen G. und Plank P.: "Gewebeverkalkungen bei Schlachttieren unter besonderer Berücksichtigung einer enzootische Kalzinose beim Rind". Schlacht und Viehhof-Z. 74:211-215. (1974).
- 114.- HARTMANN F. und Deicher H.: "Bindegewebe".In: Siegenthaler, W.u.a.; "Klinische Pathophysiologie", 3^o. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1976.
- 115.- HAUSSIER M.R.; Wasserman R.H.; Mc Cain T.A.; Peterlik M.; Bursac K.M. and Hughes M.R.: "1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Glycoside: Identification of a Calcigenic Principle of Solanum malacoxylon". Life Sciences, 18:1049-1056. (1976).
- 116.- HECTOR R.C.; George K.D.; Djafar M.I. and Simpson C. F.: Amer. J. Vet. Res., 31:685. (1970). (Citado por Cusavaplangchai, 1972).
- 117.- HENDERSHOT J.M.: "Naalehu Disease". Report of Board of Commissioner of Agr. and Forestry, Hawaii:23-24 (1942).
- 118.- HERRATH von D.; Kraft D.; Offermann G. und Schaefer K.: "Solanum malacoxylon: eine therapeutische Alternative für 1,25-Dihydroxycholecalciferol bei urämischen Calciumstoffwechselstörungen?". Dtsch. Tierärztl. Wschr., 99:2407-2409. (1974).
- 119.- HERRATH von D.; Schaefer K.; Kraft D. and Offerman G.: "Effect of Solanum malacoxylon on calcium metabolism in experimental uremia and uremic patients". Vitamin D and Probl. to Uremic Bone Dis., Berlin-New York, Walter de Gruyter & Co., 1975.

- 120.- HUMPHREYS D.: "Studies on the active principle of Solanum malacoxylon". Nat. New. Biol., 246:155-157 (1973).
- 121.- HUMPHREYS D.; Basudde C.; Varghese Z. and Moorhead, J.: "Plant induced calcinosis in animals". Vit. D and Probl. to Uremic Bone Dis., Berlin-New York, Walter de Gruyter & Co., 1975.
- 122.- JACCOTTET M.A.: "Histologie und Pathogenese der Nierenverkalkung (Nephrocalcinose und dystrophische Kalknephrose)". Virchows Arch. path. Anat., 332: 245-263. (1959).
- 123.- JENNINGS I.F.: "Algunas cardiomiopatías de los animales. Un análisis indicador de posibles analogías con enfermedades del hombre". Bol. Ofic. San. Panam. 67. (1969).
- 124.- JOEST E.: "Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere". Band II. "Zirkulations- und Hämatopoetische Organe". Herausgegeben von H. Stünzi., Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey, 1970.
- 125.- JOEST E.: "Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere". Band VII. "Respirationsapparat". Herausgegeben von G. Pallaske und H. Stünzi, Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey, 19
- 126.- JUBB K.J.F. y Kennedy P.C.: "Patología de los animales domésticos". Barcelona, Edit. Labor S.A., 1973.
- 127.- KENNEDY P.C.: Vet. College, Univ. California, California, U.S.A., Davis. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 128.- KITT T.: "Lehrbuch der Pathologischen Anatomie der Haustiere". 3. Auflage, Stuttgart, Verlag von Ferdinand Enke, 1906.
- 129.- KÖHLER H.: "Die Kalzinose des Rindes und der derzeitige Stand ihrer Erforschung". Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84:98-100. (1977).
- 130.- KÖHLER H. und Libiseller R.: "Über das Auftreten der sogenannten Weidekrankheit bei Kühen in Österreich im Zusammenhang mit Düngung und Fütterung". Zbl. Vet. Med., A. 17:289-337. (1970).
- 131.- KÖHLER H.; Leibetseder J.; Libiseller R.; Skalicky M. und Svoboda R.: "Zur Kalzinose des Rindes. I. Untersuchungen zur Pathologie und zum Phosphorstoffwechsel mehrmals an Kalzinose erkrankter Rinder". Zbl. Vet. Med., A. 21:613-637. (1974).
- 132.- KLAPP E.: "Taschenbuch der Gräser". 9. Auflage, Berlin-Hamburg, Verlag Paul Parey, 1965. (Citado por Simon y col., 1975).

- 133.- KRAFT D.; van Herrath D.; Offermann G. und Schaefer, K.: "The effect of Solanum malacoxylon on rachitic bone lesions in the rat". *Mon. Klin. und Polikl. der Freien Univ. Berlin*, 18:4. 1975.
- 134.- KRAMER v Tisdall - *Journal Biol. Chem.*, 48:223 (1921). (Citado por Collier 1927).
- 135.- KROOK L.; Wasserman R.H.; Shively J.N.; Tashjian A. H.; Brokken T.D. and Morton J.F.: "Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: Implication of the shrub, *Cestrum diurnum*, as the causative agent". *Cornell Vet.* 65:26-56. (1975).
- 136.- KROOK L.; Wasserman R.H.; McBntee K.; Brokken T.D. and Teigland M.B.: "*Cestrum diurnum* Poisoning in Florida Cattle". *The Cornell Vet.*, 5:557-575. (1975).
- 137.- KUNZ W.: "Über der Einfluss von Solanum malacoxylon (Sendtner) auf Kalzium-Phosphor- und Magnesium-Gehalt im Blutserum beim Rind nach parenteraler und oraler Applikation". 9no. Congr. Mundial de Suia-tría, París, 1976.
- 138.- KUNZ W.: "Über den Einfluss von Solanum malacoxylon (Sendtner) auf den Kalzium- und Magnesium-Gehalt im Blutserum beim Rind nach parenteraler und oraler Applikation". *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 90: 69-72. (1977).
- 139.- KHATRA M.S.; Hothi D.S.; Singh A. and Chawla R.S.: "Arteriosclerosis with metastatic calcification in Corriedale sheep in Punjab". *Atherosclerosis* 19:521-528. (1974).
- 140.- LADIZESKY M.; Cabrejas M.; Labarrere C. and Mautalen C.: "Solanum malacoxylon and Vitamin D: Comparison of its antirachitic activity and its effects on the intestinal absorption of calcium in the rat". *Acta Endocrin. Panam.*, 5:71. (1974).
- 141.- LADIZESKY M.; Mautalen C. y Camberos H.: "Solanum malacoxylon: comparación de su actividad biológica al administrarlo por vía oral o parenteral en animales de laboratorio". *Medicina* 34:127-132. (1974).
- 142.- LADIZESKY M.; Cabrejas M.; Montoreano R. and Mautalen C.: "The effect of Solanum malacoxylon on the intestinal and renal handling of calcium and phosphate in the rat". *Vit. D and Probl. related to Uremic Bone Dis.*, Berlin-New York, Walter de Gruyter & Co., 1975.
- 143.- LANDO E.; Ruksan S.E.; Arnhold J.J.; Roberts R.M. y Deshpande P. - *Est. Exp. Agrop. Calcarce, INTA*, 1965 (Citado por Carrillo y Parker, 1967).
- 144.- LANDO E.; Ruksan S.E.; Kennedy P.C.; Singleton J.B. y Deshpande P.: "Niveles de calcio y fósforo en la sangre de animales a pastoreo en campos de entequ seco". *Simp. sobre Entequ Seco*, Bol. Técn. 54 (1967).

- 145.- LANDO, E.; Ruksan, B.E.; Carrillo, B.J.; Bingley, J.S. y Deshpande, P.: "Enteque Seco, aspectos bioquímicos". Boletín Tecn. Nº 65, Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA, 3-11 (1967).
- 146.- LANDO, E.; Carrillo, B.J.; Ruksan, B.E. y Deshpande, P. D.: "Enteque Seco, aspectos bioquímicos". Bol. Téc. nº 67, Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA 3-12 (1968).
- 147.- LARSEN, A.B.; Gaggiano, O.P. y Carrillo, B.J.: Diagnóstico de paratuberculosis (Enfermedad de Johne) en vacunos afectados por Enteque Seco". Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA (Citado por Carrillo y Worker, 1967), (1964).
- 148.- LAWSON, D.E.M.; Smith, P.W. and Wilson, P.W. "Relationship of calcium uptake and calcium-binding protein synthesis in chick and rat intestine in response to Solanum malacoxylon". Fed. Europ. Bioch Soc. 45: 122 (1974).
- 149.- LIBISELLER, R.: "Über die Ursache der Kalzinose bei Rindern (Weidekrankheit) im System Boden-Düngung-Pflanze-Tier". Bericht über die 6. Arbeitstagung der Güllerei", Gumpenstein, 1974.
- 150.- LIBISELLER, R. und Gunhold, P.: "Kalzinose bei Kühen". Naturwissenschaften 56:39 (1969).
- 151.- LIBISELLER, R.; Glawisching, E.; Köhler, H. und Swoboda, R.: "Zur Kalzinose der Rinder in Österreich. II. Experimentelle Auslösung einer Kalzinose bei Schafen und Kaninchen". Zbl. Vet. Med., A. 21: 705-730. (1974).
- 152.- LIBISELLER, R.; Glawisching, E.; Köhler, H. und Swoboda, R.: "Zur Kalzinose der Rinder. III. Experimentelle Auslösung einer Kalzinose bei Schafen und Kaninchen durch grünen Goldhafer (Trisetum flavescens) aus dem pannonischen Klimagebiet". Zbl. Vet. Med., A. 23:1-30 (1976).
- 153.- LIGNIERES, J.: "Contribution a l'etude de la pasteurellose bovine connue en Argentine sous les noms de Diarrhée et d'Entéqué". Bol. Soc. Centr. Med. Vet., Nouvelle Serie, París, 16: 761-792, (1908).
- 154.- LIGNIERES, J.: "Arteriosclerosis epidémica en el ovino". Rev. Zootec., Bs. As., 4 (1-7 (1912) y Amer. Vet. Rev. 44:284 (1917).
- 155.- LOPEZ T.A.: "Investigaciones sobre la naturaleza química del tóxico del duraznillo blanco Solanum malacoxylon Sendt". Rev. Inv. Agrop., S.4, P.A., INTA, X, nº 3: 93-104 (1973).
- 156.- LUBARSCH, O. Und Ostertag, R.: "Ergebnisse der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie des Menschen und der Tiere". 11. Jahrgang, 1907.

- 157.- LYND, F.T.: "Disturbance of Mineral Metabolism in Naalehu Disease of Cattle". Univ. Texas Medical Sch. San Antonio, November, 1969.
- 158.- LYND, F.T.; Willers, E.H.; Weight, L.A. and Gebauer, P. W.: "Bovine Arteriosclerosis in Hawaii". Amer. J. Vet. Res. 26: 1344-1349 (1965).
- 159.- MALINOW, M.R. and Maruffo, C.A.: "Aortic Atherosclerosis in Free-ranging Howler Monkeys (*Alouatta caraya*)". Nature 206: 948-951 (1965).
- 160.- MANSTON, R. and Payne, J.M.: "Mineral imbalance in pregnant milkfever-prone cows and the value and possible toxic effects of treatment with vitamin D₂ and dihydrotachysterol". Brit. Vet. J. 120:167-177. (Citado por Spiess, 1974).
- 161.- MARUFFO, C.A. and Molinow, M.R.: "Aortic Mediosclerotic changes in a Howler Monkey (*Alouatta caraya*)". The J. Pathol. and Bact. 92: 236-237 (1966)
- 162.- MASSELIN, J.N. y Chiaravalle, A.M.: "Frecuencia de la esclerosis aórtica en el bovino". Rev. Inv. Agrop., INTA, S.4, P.A., II, nº 10-117-147 (1965).
- 163.- MASSELIN, J.N.; Abadie, G.J.; Monesiglio, J.C. y Rossi, F.M.: "Acción del extracto etéreo del duraznillo blanco (*Solanum malacoxylon*)". Rev. Inv. Agrop., INTA, S.4 P.A., IV, nº 1 1-19 (1969).
- 164.- MASSELIN J.N.; Gaggino, O.P.; Monesiglio, J.C. y Parodi, J.J.: "Efectos de la administración a ratas de Extractos Etéreos de algunos Vegetales". Rev. Inv. Agrop., INTA, S.4, P.A., VIII, nº 4 (1971).
- 165.- MAUTALEN, C.A.: "Calcitonina". Bol. Endocr. y Metab., Bs.As., 10:95-110 (1971).
- 166.- MAUTALEN, C.A.: "Mecanismo de acción del *Solanum malacoxylon* sobre el metabolismo mineral en el conejo". Rev. Argent. de Endocr. y Metab. 17:1-18 (1971)
- 167.- MAUTALEN, C.A. y Rossi, F.M.: "Efecto del *Solanum malacoxylon* sobre el metabolismo fosfocálcico en el conejo". Medicina, Bs.As., 30: 433 (1970).
- 168.- MICHEL, M.C.: "Role des profils metaboliques dans la recherche des causes des maladies de production dans l'espece bovine", 9º Congres Inter. sur les maladies du bétail, Paris, 1976.
- 169.- Mc COSKER, P. - 1975 (Citado por Riet Correa y col., 1975).
- 170.- Mc TAGGART, H.S.: "Depression of Serum Mg levels in ruminants by vitamin D". Vet. Rec. 72 (1960): 1135 (Citado por Spiess, 1974).

- 171.- MOLFINO, R.H.; Alonso, R. y Riccitelli, J.A.: "Posibles causas edáficas del Enteque Seco". Rev.Fac.Agron. La Plata, 31: 53-80 (1955).
- 172.- MOORHEAD, J.F.; Humphreys, D.J.; Varghese, Z.; Basudde, C.D.K.; Jenkins, M.V. and Wills, M.R.: "Studies on vitamin D-like action of Solanum malacoxylon". Vit.D and Probl.related to Uremic Bone Dis., Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York, 1975.
- 173.- MOTT, N.: "In jede Grünlandsaat gehört Goldhafer". Bayer.Landw. Wochenbl.nº 15, 1961 (Citado por Simon y col., 1975).
- 174.- MÜLLER, S.M. y Casal, J.J.: "Valores en suero bovino de colesterol total, libre, esterificado y asociado a alfa y beta lipoproteínas. Relación entre bovinos normales y con Enteque Seco". Rev.Inv.Agrup. INTA, S.4, P.A., II, nº 8:95 (1965).
- 175.- NEUMAN, F.; Nobel, T. and Klopfer, U.: "Calcinosis in Goats". J.Comp.Pathol. 83: 343-350 (1973).
- 176.- NIEC, R. y Carrillo B.J.: Est.Exper. Agron. Balcarce INTA, 1963 (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 177.- NORMAN, A.W.: "Gegenwärtige Vorstellung zum biochemischen Wirkungsmechanismus von Vitamin D". Münch.Med Wschr. 116: 1585-1598 (1974).
- 178.- NORMAN, A.W. and Henry, H.: "The role of the kidney and vitamin D metabolism in health and disease". Clin.Orthop.rel.Res. 98:258-289 (1974).
- 179.- NOSEDA, R.P.; Cumba, S.A.; Gimeno, E.J.; Bardón, J.C.; Borrajo, H.; Maida, J.C. y Forastieri, H.: "Reproducción experimental de Enteque Seco por duraznillo blanco, su tratamiento y posterior estudio comparativo de animales tratados y no tratados". Gac.Vet.38:105-112 (1976).
- 180.- O'DONNELL, J.M. and Smith M.W.: "Vitamin D-like action of Solanum malacoxylon on Calcium Transport by Rat Intestine". Nature 244: 357-358 (1973).
- 181.- OKADA, K.A.- Est.Exp.Agrup. Balcarce, INTA, 1965 (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 182.- OMDAHL, L.J. and De Luca, H.F.: "Rachetogenic activity of dietary strontium. I. Inhibition of intestinal calcium absorption and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis". J.Biol.Chem.247:5520-5526 (1972).
- 183.- ONDERSCHIEKA, K.; Laber, S.; Szekely, H. und Binder, K.: "Chronischer Magnesiummangel bei Kühen". Wiener Tierärztl. Monatsschr. 54: 219-236 (1967).
- 184.- OUSAVAPLANGCHAI, L.: "Vergleichende Untersuchungen sur Histopathologie der Intoxikation mi Vitamin D₃ und Solanum malacoxylon beim Meerschweinchen". Dis. Wien. 1972.

- 185.- PAOLI, A.R.J.: "estructura y dinámica edáfica en relación a los problemas carenciales de los animales. Reguladores oligodinámicos". Primeras Jornadas Méd. Vet. de Bahía Blanca, 1969.
- 186.- PAOLI, A.R.J.: "Sinopsis del entequo seco en bovinos" Revista Hereford, 660-663 (1970).
- 187.- PAOLI, A.R.J.: "El suelo en relación a los problemas carenciales de los animales. Reguladores oligodinámicos". Rev.Med.Vet. 51: 249-256.(1970)
- 188.- PAOLI, A.R.J.: "lesión traumática típica en hueso por contracción de los flexores de los miembros anteriores en bovinos con entequo seco". Rev.Med.Vet. 51: 175-178 (1970).
- 189.- PAOLI, A.R.J.: "Difusión geográfica del Entequo Seco en la Provincia de Buenos Aires. (Comunicación preliminar)". Gac.Vet.33:132-138 nº 249 (1971).
- 190.- PAOLI, A.R.J.: "Difusión geográfica del Entequo Seco en la Provincia de Buenos Aires (Segunda Parte). Gac.Vet. 33:235-242, nº 251 (1971).
- 191.- PAOLI, A.R.J.: "Difusión geográfica del Entequo Seco en la Provincia de Buenos Aires (Tercera parte)". Gac/Vet. 33:407-428 nº 254 (1971).
- 192.- PAOLI, A.R.J.: "Ecología, Nutrición y Salud". Rev.Med. Vet. 52: 123-127 (1971).
- 193.- PAOLI, A.R.J.: y Lurati, M.S.: "Consideraciones sobre la importancia de los oligoelementos del suelo". IDIA Nº 177, Sep. INTA, BS.AS., 1962.
- 194.- PAOLI, A.R.J.; Gallo, G.G.; Galofré, E.J.; Portillo, A.G.; Torres Moreno, A.; Iseas, F. y Cassagne, M.: Estudio preliminar sobre tratamiento terapéutico del entequo seco en bovinos". Rev.Fac.C.Vet.La Plata, X nº 22 39-53 (1968).
- 195.- PAOLI, A.R.J. y Galofré, E.J.: "Ficocoloides en Terapéutica 2da. parte: Antecedentes y Resultados a publicar". Rev.Med.Vet.52:2-8 (1971).
- 196.- PAOLI, A.R.J.; Galofré, E.J.; Gallo, G.G. e Iseas, F.: "Los ficocoloides Quelatados en el tratamiento y prevención de Estados Deficitarios y/o carenciales" XIX Congreso Mundial de Med.Vet. y Zootec., Méjico 1971; y Rev.Med.Vet. 52:981 (1971).
- 197.- PAOLI, A.R.J.; Galofré, E.J. y Bajer, R.G.: "Ficocoloides en Terapéutica" (Segunda parte" Rev.Med.Vet.52: 2-8 (1971).
- 198.- PAOLI, A.R.J.; Gallo, G.G.; Galofré, E.J.; Torres Moreno A. e Iseas, F.: "Ficocoloides Quelatados en Terapéutica Animal. Rev.Med.Vet.52: 1016 (1971).

- 199.- PAOLI, A.R.J.; Galozi S.E.J.; Gallo G.G.; Fernandez M. Liger, J.H. y Vidal Ponte, G.: "Manejo de los ficocoloides quelatados en el tratamiento del enteque seco asociado a otros estados carenciales de los bovinos en zonas entecaderas". Ler. Congreso Latinoamericano de Buiatría, Univ. Nac. de La Plata, 1972.
- 200.- PARDI, M.C. e Santos J.A. dos: "Ossificação pulmonar e calcificação vascular em bovinos do pantanal Mato Grossense". Soc. Bras. Med. Vet., 11-4-1946.
- 201.- PARDI, M.C. e Santos J.A. dos: "Ossificação pulmonar e calcificação vascular em bovinos do pantanal Mato Grossense". Veterinaria, Rio de Janeiro, 1:3-7 (1971).
- 202.- PETERLIK, M. -Vortrag vor der Oesterr. Bioch. Gesellschaft in Wien am 31.5.1976 (Citado por Köhler, 1977).
- 203.- PETERLIK, M. and Wasserman, R.H.: "1,25-dihydroxycholecalciferol-like activity in Solanum malacoxylon: Purification and partial characterization" FEBS Letters 56: 16-19 (1975).
- 204.- PETERLIK, M.; Bursac, K.; Hausler, M.R.; Hughes, M.R. and Wasserman, R.H.: "Further Evidence for the 1,25-Dihydroxyvitamin D-Like Activity of Solanum malacoxylon" Bioch. and Bioph. Res. Comm., 70: 797-804 (1976).
- 205.- PIRES, R.E. "Ossificação em pulmão de bovino". Rev. Fac. Med. Vet. S. Paulo 2: 77-84 (1942).
- 206.- PLANK, P.; Hähichen, T. und Dirksen, G.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 9. Untersuchungen über den Einfluss der Düngung auf die pathogene Wirkung von Kalzinose-Weiden". Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83: 159-161 (1976).
- 207.- REINOSO CASTRO, H. "Enteque Seco. Reproducción experimental en bovinos". Rev. Med. Vet. 51 (1970).
- 208.- REISNER, K.; und Seifert, G.: "Häufigkeit Lokalisation und Pathogenese der Herzgerüstverhärtung". Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. 355: 1-18 (1972).
- 209.- REISINGER, G.: "Licht- und Elektronenoptische Untersuchungen sur unspezifischen Organkalzinose nach Verabreichung von Dihydrotachysterol (DHT) an Ratten". Zbl. Vet. Med. A., 24: 30-56 (1977).
- 210.- RIET CORREA, F.; Riet Correa, I. y Collagamba, C.: "Calcificación metastática enzootica (enteque seco) en bovinos del Uruguay". Veterinaria, Montevideo, XII 60: 15-25 (1975).
- 211.- RIGON, P.: "El suelo y los enteques (Enteque y Enteque Seco)". Rev. Hereford 208: 211-213 (1958).
- 212.- RIGON, P.: "La eliminación de los enteques seco y parasitario". Rev. Hereford 208: 354-355 (1955).

- 213.- ROMEIS B.: "Mikroskopische Technik". R. Oldenburg Verlag, München-Lien, 1968.
- 214.- ROSS, E. and Furamoto H.H.: "The effect of Dried Fruit of Solanum sodomaeum on Japanese Quail and White Leghorn Cockerel Chicks". Poultry Sc., 49: 13-15. (1970).
- 215.- ROSS, E.; Simpson C.F.; Rowland L.C. and Harms R.H.: "Toxicity of Solanum sodomaeum and Solanum malacoxylon to Chick". Poultry Sc., 50:870-873. (1971).
- 216.- ROSSI, F.M.; Dallarso M.E.; Daskal H.E.; Gaggino O.P. y Leiva A.: "Reproducción experimental del Enteque Seco en Conejo. 1. Lesiones Cardiovasculares". Gaceta Veterinaria, 31(230):415-426. 1989).
- 217.- RUAGER J.: "Enteque Seco. Valores de calcio, fósforo y magnesio séricos e índices hematimétricos". Tesis. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, La Plata. (Prov. Bs. Aires), año 1964.
- 218.- RUAGER J.: "Enteque Seco". Seventh FAO/SIDA International Postgraduate Course in Veterinary Pathology, Stockholm, 9:43-47. (1974).
- 219.- RUAGER J.; Schudel A.; Martín A.A. y Quinteros I.R.: "Estudio de microelementos, proteínas séricas y valores hematimétricos en bovinos atacados de Enteque Seco". 3^{ra} Jornadas. Facultad de Ciencias Veterinarias. La Plata. Univ. Nacional. La Plata, 1964.
- 220.- RUAGER J.; Iturriza F.C. y Martín A.A.: "Nuclear Vacuolization of the Parafollicular Cells of the Thyroid Gland in a Curious Disease of Bovines". Rev. Arg. Endocr. Metab., 16:159-164. (1970).
- 221.- RUAGER J. y Gimeno E.J.: "Enteque Seco en equinos, caprinos y ovinos". En prensa. Gaceta Veterinaria, año 1977.
- 222.- RUDARTH S. und Björklund N.-E.: "Störungen in Kalkgehalt der Gewebe". In: W. Frei, "Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin", 6. Auflage, Berlin, Paul Parey Verlag, 1972.
- 223.- RUDINO M.C.: "Sobre un caso de verdadera osificación de la aorta en un bovino". Rev. Med. Vet., 3(1919).
- 224.- RUKSAN B.E.; Landó E.; Bingley J.D.; Kennedy P.C. y Deshpande P.D. - &mo. Congreso Panam. de Farm. y Bioq. Buenos Aires (Rep. Argentina), 1966.
- 225.- RUKSAN B.E. y Carrillo B.J.: "Efecto en ovinos del Solanum malacoxylon incubado con líquido de rumen". Medicina (Buenos Aires), 36:318-322 (1976).
- 226.- SAETTONE A.: "Enteque Seco de los Vacunos". Ministerio de Agric. de la Nación, Bs. Aires. Informe del 29-11-1954.

- 227.- SANSOM, G.; Vagg M. and Döbereiner J.: "The effects of *Solanum malacoxylon* on Calcium Metabolism in Cattle". *Res. Vet. Science* 12:604-605 (1971).
- 228.- SCARPELLI D.G.: "Experimental Nephrocalcinosis". *Lab.Inv.*, 14:123-141. (1965).
- 229.- SELYE H.: "Calciophylaxis". Chicago Univ.Press, 1962
- 230.- SELYE H. and Nielsen E.: "Histogenesis of experimental cutaneous calcinosis". *Acta Morph. Acad. Sc. Hung.*, 10:327-332. (1961).
- 231.- SIMESSEN MG.: "Enzootisk calcinose og andre plante-inducerede calcinoser". *Nord. Vet.-Med.* 29:76-89. (1977).
- 232.- SIMON U.: "Über die botanische Zusammensetzung von Heuproben aus dem nördlichen Teil des Alpenvorlandes (Schwaben, Landkreis Mindelheim)". *Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz*, 2:68-82 (1951). (Citado por Simón y col., 1975).
- 233.- SIMON U.; Daniel P. y Dirksen G.: "Der Goldhafer (*Trisetum flavescens* (L.) P.B.), hochwertiges Futtergras oder Schadpflanze?". *Ergeb. Landw. Forschung Justus Liebig-Universität, Giessen* 13:104-113. (1975)
- 234.- SIMON U.; Daniel P. und Dirksen G.: "Zur Bewertung des Goldhafers (*Trisetum flavescens* (L.) P.B.) als Futterpflanze im Licht neuer Ergebnisse der Kalzinose-Forschung". *Das Wirtsch.Futter* 21 (1975).
- 235.- SINGH G.; Gill B.S. and Randdhawa N.S.: "Enzootic Calcinosis in Sheep: Soil-Plant-Animal Relationship". *Amer.J.Vet. Res.*, 37:553-556. (1976).
- 236.- SIVORI F.: "Osificación de los pulmones de los bovinos". *Anales del Círculo Médico Argentino*, 1896. (Citado por Sivori, 1911).
- 237.- SIVORI F.: "La Mancha de los Ovinos". Universidad Nacional de La Plata, 1911.
- 238.- SPIAZZI R.B. - Comunicación personal a J.Ruager, 1977
- 239.- SPIESS, A.: "Weitere Beobachtungen über Wesen und Verlauf der enzootische Kalzinose des Rindes". *Justus Liebig-Universität, Giessen, Diss.*, 1974.
- 240.- STAHLIN A.: "Handbuch der Futtermittel. Bd.I., Grünfutter und Heu". Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey, 1969. (Citado por Simon y col., 1975).
- 241.- STROHMEYER G.: "Ernährung". In: Siegenthaler, W.u.a.; "Klinische Pathophysiologie", 3^o Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1976.
- 242.- THOINOT L.H. et Masselin E.J.: "Précis de Microbiologie-Technique et Microbes Pathogenes". Paris, Masson & Cie., 1902.

- 243.- TIBIRICA P. de Q.T.: "Arteriosclerose bovina". *Annaes Fac.Med. S.Paulo* 2:311-372. (1927).
- 244.- TIBIRICA P. de Q.T.: "Ossificação na aorta bovina". *Annaes Fac.Med.S. Paulo*, 2:372-381. (1927).
- 245.- TOMARINIA C.H. e Döbereiner J.: "Espichamento, Intoxicação de Bovinos por *Solanum malacoxylon* no Pantanal de Matto Grosso.II.Estudos Complementares". *Pesqu. Agrop. Bras. Sér. Vet.* 9:53-62. (1974).
- 246.- TUÑON E.F.; Berardo A.B.; Petroni R.I.; Godz P. y Culot P.: -Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA, 1965. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 247.- TUÑON E.F. y Culot P. - Est. Expe. Agrop. Balcarce, INTA, 1965. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 248.- TUSTIN R.; Piennar C.; Schmith J.; Paul J.; van der Walt K.; Boyazoglu P. and Boom H.: "Enzootic Calcification of Sheep in South Africa". *J.S. Afr. vet. Ass.* 44:383-395. (1973).
- 249.- URIBE A.; Holick M.F.; Jorgensen N.A. and De Luca H. F.: "Action of *Solanum malacoxylon* on Calcium Metabolism in the Rat". *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 58:257-262. (1974).
- 250.- URRY D.I.: "Neutral Sites for Calcium Ion Binding to Elastin and Collagen: A charge Neutralization Theory for Calcification and Its Relationship to Atherosclerosis". *Proc. Nat. Acad. Sc., U.S.A.*, 65(4): 10-14 (1971).
- 251.- VASCONCELLOS A. de: "Ossificação de pulmão de um bovino Enteké". *Rev. Vet.Zootec.*, Rio de Janeiro, 7: 390-392. (1916).
- 252.- VAN OERS J. and Worker N.A. - Est. Exp. Agrop. Balcarce, INTA, 1966. (Citado por Carrillo y Worker, 1967).
- 253.- VIRCHOW, R.: "Kalk-Metastasen". *Virchow Arch.Path. Anat.*, 8:103. (1855). (Citado por Scarpelli, 1965).
- 254.- WAARD - *Biochem. Zeitschr.* 97:176 (1919). (Citado por Collier, 1927).
- 255.- WALLING M.W. and Simberg D.V.: "Effects of lalfa, 25-Dihydroxyvitamin D3 and *Solanum glaucophyllum* on Intestine Calcium and Phosphate Transport and on Plasma Ca., Mg. and P. Levels in the Rat". *Endocrinology*, 97:1567-1576. (1975).
- 256.- WALLING M.W. and Simberg, D.V.: "Calcium absorption by intestine: stimulation in vitamin D-deficient nephrectomized rats by *Solanum malacoxylon*". *Gastroenterology*, 69:200-205. (1975).

- 257.- WALLING M.W.; Kimberg D.V.; Lloyd M.; Proccal, D.; Wells, H. and Norman A.: "Solanum glaucophylon (malacoxylon): An apparent source of a water-soluble, functional and structural analogue of 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3". Vit.D and Probl.related to Uremic Bone Dis., Walter de Gruyter & Co., Berlin New York, 1975.
- 258.- WASE A.W. - Fed.Proc. 31:708 (1972). (Citado por Wasserman, 1975).
- 259.- WASSERMAN R.H.: "Calcium absorption and Calcium-Binding-Protein Synthesis.Solanum malacoxylon Reverses Strontium Inhibition". Science, 183:1092-1094. (1974)
- 260.- WASSERMAN R.H.: "Active Vitamin D-Like Substances in Solanum malacoxylon and other Calcinogenic Plants". Nutrition Reviews, 33:1-5. (1975).
- 261.- WASSERMAN R.H. und Taylor A.N.: "Die physiologische Bedeutung des Vitamin-D-abhängigen calciumbindenden Proteins". Triangel 12:119-127. (1974).
- 262.- WASSERMAN R.H.; Bar A.; Corradino R.A.; Taylor A.N. and Peterlik M.: "Calcium absorption and calcium-binding protein synthesis in the chick:Evidence for a 1,25-dihydroxycholecalciferol-like factor in Solanum malacoxylon". In: Calcium Reg. Hormones (Talmage, R.V.; Owen, M. and Parsons, J.A.; eds.). Amsterdam, Excerpta-Medica, 1977. pag. 318/319.
- 263.- WASSERMAN R.H.; Corradino R.A. and Krook, L.: "Cestrum diurnum:A domestic Plant with 1,25 Dihydroxycholecalciferol-Like Activity". Bioch. and Bioph. Res. Comm., 62:85-91, (1975).
- 264.- WASSERMAN R.H.; Corradino R.A.; Krook L.; Hughes M. and Haussler M.: "Studies on the 1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol-Like Activity in a Calcinogenic Plant,Cestrum diurnum in the Chick". J. Nutr. 106: 457-465, (1976).
- 265.- WILLERS E.H.; Lynd, F.T.; Weight, L.A. and Miyahara, A.J.: "Experimental Studies of Bovine Arteriosclerosis in Hawaii". J.Vet. Res., 26:1350-1355.(1965).
- 266.- WOLF, M.: "Untersuchungen über die Kalzinogene Aktivität von Trisetum flavescens(L.) P.A.) am Kaninchen". Ludwig-Maximilians Universität, München, Diss.1976
- 267.- WOLF, M. und Dirksen G.: "Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.10.Untersuchungen über den Einfluss von Trisetum flavescens(L.) P.A., auf den Kalzium- und Phosphorspiegel im Blutplasma des Kaninchens". Dtsch. Tierärztl. Wschr., 83:391-430. (1976).
- 268.- FORNER, N.A. and Carrillo B.J.: "Calcification and Wasting in Grazing Animals in the Argentine". Nature, 215:72-74. (1967).

269.- ZACCARDI, E.M.: "Cuadro electrofnocar diográfico en un bovino atacado de enteque seco". Rev.Fac.C.Vet. La Plata, X, nº 24; 375 (1968).

270.- ZSCHOKKE, W.: "Über Ossifikationen in der Lunge von Tieren". Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich, Diss., 1919.

.

Al llegar a este punto, sólo me resta agradecer a quienes de alguna manera posibilitaron mi tarea; y en especial:

Al Profesor Dr. Gerrit Dirksen y al Dr. Manfred Wolf y por su intermedio a todo el personal docente y no docente de la 2da. Clínica Médica, Facultad de Veterinaria de la Universidad Ludwig-Maximilians en Munich, República Federal de Alemania.

Al Doctor Tilo Hänichen y a todos los integrantes del Instituto de Patología General y Anatomía Patológica (Profesor Dr. J. von Sandersleben), de la mencionada Facultad.

Al profesor Dr. Jorge Ruager y a todos aquellos que desempeñan funciones en la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas de nuestra Facultad.

-ooOoo-

Una parte de este trabajo fué desarrollada en la República Federal de Alemania mediante una beca del Centro de Asuntos Alimenticios y de Fomento Agrícola de la Fundación Alemana para el Desarrollo Internacional. Para los estudios realizados en nuestra Facultad, contamos con el apoyo financiero de CAFPTA (Plan N° 321 de 1977).

-ooOoo-

- REGLAMENTACION DE TESIS:

Artículo 7mo.: "La Facultad no se hace solidaria de
las opiniones vertidas en una Tesis.
