

# Aportes al conocimiento de la patogenia de la calcinosis enzoótica en rumiantes\*

## RESUMEN

### INTRODUCCION

La calcinosis enzoótica de los bovinos es causada por una intoxicación vegetal crónica. Esta enfermedad, bien conocida en la Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, ha recibido distintas denominaciones: "enteque ossificans", "bichoquera", "guata-í" (del guaraní: caminar corto), "espichamento", "espichaço", y más corrientemente "enteque seco".

Cuadros similares se han descrito en diversas regiones del mundo afectando a animales en pastoreo. En todos ellos, la deposición de sales de calcio en los tejidos blandos, se acompaña de un severo deterioro físico con depreciación de las reses. Hasta el momento se han encontrado cinco plantas que inducen calcinosis sistémica por intoxicación crónica: *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum*, *Solanum torvum*, *Trisetum flavescens* y *Nierembergia veitchii*.

El principal vegetal calcinogénico, reconocido por el momento en Sud América, es el vulgarmente llamado "duraznillo blanco", también conocido en ciertas áreas como "i-byra-né", "palo-né", "yuyo hediondo del agua" o "palc hediondo". El "duraznillo blanco" fue descrito por primera vez en 1829 por Desfontaines bajo la denominación de *Solanum glaucophyllum*. Posteriormente recibió distintas denominaciones: *S. malacoxylon* por Sendtner, *S. glaucum* por Dunal, *S. glaucescens* por Baile y *S. glaucofrutescens* por Larrañaga. El nombre original y al que nos remitiremos es, en consecuencia, *Solanum glaucophyllum* (Sg).

El Sg es muy poco apetitoso y los animales usualmente no lo ingieren. No obstante, en períodos de sequía, los animales ingieren especialmente brotes tiernos u hojas caídas y mezcladas con la pastura. Tan sólo 12 gramos semanales de hojas de duraznillo durante 4 meses, alcanzan para reproducir la enfermedad en un bovino de 300 Kg; un vacuno que ingiera 50 hojas por día se presentará clínicamente enfermo en 8 a 10 semanas.

El Sg tiene distintos metabolitos de la vitamina D, especialmente cantidades enormes de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  unido a un glicósido.

Los vacunos clínicamente afectados presentan un avanzado estado de caquexia, con atrofia muscular y atrofia serosa de la grasa. La inspección del cadáver revela calcificaciones extensas en el sistema circulatorio, pulmones, serosas, tendones y ligamentos. En casos avanzados se presentan lesiones de desgaste y ulceración en los cartílagos articulares. Las lesiones microscópicas consisten, básicamente, en áreas de mineralización, von Kossa positivas,

\*Proyecto de investigación financiado parcialmente por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria y realizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Académico Responsable Dr. Eduardo Juan Gimeno. Investigadores ejecutores del proyecto: Dr. Enrique Leo Portiansky, Dr. Claudio Gustavo Barbeito, Med. Vet. María Soledad Gomar, Dra. Patricia Elena Fernández, Med. Vet. Fabiana Beatriz Paulovich y Med. Vet. Paula Andrea Fontana.

en una masa de polisacáridos. En las arterias, los focos de calcificación se presentan en la capa media, con fragmentación de fibras elásticas. En casos avanzados pueden observarse proliferación conjuntiva subendotelial y metaplasias conjuntivas con formación de células condroides.

El diagnóstico clínico de esta afección es relativamente sencillo: los signos clínicos y los hallazgos de necropsia son característicos. Además, la enfermedad hace su aparición en verano y otoño, especialmente en épocas de sequía y siempre en potreros "entecadores". En casos subclínicos y para un correcto diagnóstico diferencial, resulta útil la determinación de los valores séricos de calcio y fósforo, especialmente combinando los valores de ambos (se considera que el valor normal del producto de calcemia por fosfatemia es de 60). No obstante es un método que adolece de imprecisiones y existen problemas para el diagnóstico temprano de la enfermedad y ocasionalmente para el diagnóstico diferencial.

Asimismo, se han intentado dosar los niveles séricos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como elemento diagnóstico, pero sus valores aumentan y disminuyen rápidamente después de la administración de *Solanum glaucophyllum*. La cuantificación de diferentes productos originados por la acción de los receptores de vitamina D (VDR) podría tener valor en el diagnóstico certero y temprano de la enfermedad. En ese sentido, se podría intentar la determinación de osteocalcina (OC), osteonectina (ON), osteopontina (OP), involucrina (INV) y de otras proteínas inducidas por el efecto de la vitamina D, en la diferenciación celular en distintos tejidos. OC, OP y ON son parte de las llamadas proteínas no-colágenas del hueso ("non-collagenous bone proteins"). En condiciones normales, éstas sólo se encuentran en tejido óseo y son importantes en el proceso normal de osificación. La INV, por su parte, es una proteína que se expresa, en las capas superiores de la epidermis normal. La lista no se agota con las sustancias mencionadas, ya que los productos de los elementos que responden a los receptores de vitamina D (VDRE) son numerosos.

El objetivo principal del proyecto fué determinar la expresión de marcadores celulares, tisulares y sanguíneos normales y evaluar las modificaciones observadas en la intoxicación de bovinos con Sg.

## **METODOS Y RESULTADOS**

Se estudiaron cortes histológicos de piel de vaquillonas intoxicadas experimentalmente con Sg y de animales normales. Se analizaron marcadores de diferenciación y de proliferación (citoqueratinas 10 and 11: CK10 - 11, involucrina: INV y antígeno nuclear de proliferación celular: PCNA) mediante técnicas inmuohistoquímicas. Los tejidos teñidos mediante dichas técnicas fueron estudiados mediante un analizador digital de imágenes y los resultados interpretados estadísticamente.

Los vacunos intoxicados mostraron una disminución estadísticamente significativa del espesor de la epidermis debido a la disminución del número de capas celulares, atrofia cuali y cuantitativa de glándulas sebáceas y sudoríparas y cambios en los folículos pilosos (transformación de folículos de la fase de anagén a fase de telogén). La intensidad y distribución de los marcadores de

diferenciación analizados se modificaron profundamente por efectos de la intoxicación con Sg. Los marcadores CK10 – 11 e INV se presentaron en las capas suprabasales de los controles, mientras que en los animales intoxicados se expresaron en todas las capas. La inmunoreactividad a PCNA fue profusa en la capa germinativa de la epidermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas.

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica en aortas y pulmones de ovejas intoxicadas espontáneamente por *Nierembergia veitchii* y en conejos intoxicados experimentalmente con Sg. Se marcaron "in situ" condroitin sulfato (CS) y las tres proteínas óseas no-colágenas antes mencionadas: OC, ON y OP. Las alteraciones ultraestructurales detectadas en aortas y pulmones consistieron en activación de fibroblastos intersticiales y profundas modificaciones en las células musculares lisas (SMCs). Estas últimas mostraron un incremento del retículo endoplásmico rugoso y en el número de mitocondrias y de ribosomas libres. Las miofibrillas decrecieron drásticamente. En los animales experimentales aumentó la matriz extracelular y se presentaron precipitaciones de calcio en forma de agregados amorfos o laminares. Se encontraron cristales de calcio en macrófagos y en células gigantes multinucleadas. Las proteínas OC, ON y OP se detectaron, mediante técnicas inmunohistoquímicas, en el citoplasma de macrófagos activados, SMCs modificadas y en la matriz extracelular. El CS fue detectado solamente en el cartílago de los bronquios.

El sistema colágeno y elástico fueron estudiados cuantitativamente en aortas de vacunos intoxicados con Sg y animales controles. La identificación de las fibras de colágeno fue realizada mediante coloración con la técnica de Picrosirius y observación microscópica con luz polarizada. El sistema de fibras elásticas fue analizado en tres cortes secuenciales con cada una de los siguientes métodos: Verhoeff's para demostrar fibras elásticas maduras, Weigert's resorcina-fucsina para demostrar fibras eulanínicas (que contienen menos elastina) y Weigert's resorcina - fucsina para fibras oxitalánicas. Mediante el método del Picrosirius fue posible diferenciar dos tipos de fibras colágenas: delgadas, verdes y débilmente birrefringentes, características de fibras de reticulina, y fascículos gruesos rojo – amarillentos característicos de las fibras colágenas. Las fibras de colágeno, presentes en un 20% en los animales controles descendieron a menos de 4 % luego de 8 semanas de intoxicación. Las fibras de reticulina fluctuaron entre un 2,38 % en los controles y 1,41 % en los intoxicados. Con respecto a las fibras elásticas (positivas a Verhoeff), se observó una caída significativa después de 15 días de intoxicación. Las fibras oxitalánicas disminuyeron después de 30 días de intoxicación.

## **DISCUSION Y CONCLUSIONES**

La aparición de trastornos cutáneos, caracterizados por pelaje desordenado y falta de brillo se asocia con la calcinosis enzoótica desde fines del siglo XIX. No obstante, no hemos encontrado descripciones histológicas de la piel en animales afectados por hipervitaminosis D. Nuestros estudios indican que la

intoxicación con Sg induce atrofia de distintas estructuras de la piel. La expresión de INV y CK 10 y 11 en todas las capas de la epidermis, incluso en la capa germinativa, está de acuerdo con lo esperado según los efectos que ejerce el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sobre la diferenciación celular. La división celular, se presentó reducida, aún cuando ese dato no fue estadísticamente significativo. Los resultados indican que la atrofia de la epidermis es el resultado de un incremento en la velocidad del proceso de diferenciación de los queratinocitos suprabasales.

La diferenciación de células mesenquimáticas a tejido cartilaginoso u óseo, es una característica repetidamente comunicada en la histopatología de la calcinosis enzoótica. Los cambios de las SMCs han sido directamente atribuidos al efecto del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Se ha demostrado que las células mesenquimáticas de aorta y pulmón segregan OC, ON y OP al espacio extracelular. La expresión de estas proteínas es inducida por efecto del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sobre genes que específicamente responden a la vitamina D. La mencionadas proteínas óseas no - colágenas juegan un rol fundamental en el proceso de diferenciación, activación celular y mineralización de tejidos duros. No obstante, existen muy pocos estudios referidos a la participación de esas proteínas en calcificaciones patológicas.

Se ha demostrado, asimismo, que en la pared de la aorta se produce una reducción de colágeno con respecto a las fibras de reticulina y una disminución de fibras de elastina a medida que avanza la intoxicación con Sg. Estudios recientes indican que el  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  desregula (down regulates) la síntesis de colágeno tipo I y de tropoelastina. En consecuencia, los cambios observados en la aorta de animales intoxicados con Sg pueden ser atribuidos al efecto de los altos niveles de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La disminución de colágeno y elastina puede estar también relacionada con el depósito de proteínas óseas no - colágenas y de proteoglicanos.

Estos resultados también demuestran que la intoxicación con Sg genera alteraciones estructurales y funcionales del sistema inmune y de las células relacionadas con el mismo, aspecto este totalmente desconocido hasta el momento.

Los resultados del presente estudio indican que la diferenciación celular juega un rol central en la aparición de las lesiones características de la calcinosis enzoótica. Resulta también evidente que quedan aún muchos aspectos desconocidos en la patogenia de este trastorno.

## Trabajos realizados en el marco del proyecto

- \* Aguirre JI, Gomar MS, Igal S, Quiroga MA, Portiansky EL and Gimeno EJ. Bone tissue and growth plate abnormalities observed after a subacute intoxication with *Solanum glaucophyllum* in rabbits. *Pesquisa Veterinária Brasileira* (Aceptado).
- \* Barros SS and Gimeno EJ. Cell differentiation and bone protein synthesis in the lung of sheep affected by spontaneous calcinosis. *Journal of Comparative Pathology* 123, 270-277, 2000.
- \* Costa EF. Efectos de la intoxicación por *Solanum glaucophyllum* sobre el tejido óseo y los niveles séricos de osteocalcina. Trabajo de tesis de la Carrera del Doctorado en Ciencias Veterinarias. Dirección: Gimeno, EJ e Idiart JR. FCV. UNLP. En realización.
- \* Dallorso ME. Evaluación de la toxicidad del *Solanum glaucophyllum* sobre un modelo experimental in vivo. Trabajo de tesis de la Carrera del Doctorado en Ciencias Veterinarias. FCV. UBA. Finalizada 11-10-2002.
- \* Fontana PA. Evaluación morfológica y funcional del sistema inmune y de células asociadas al mismo, en animales intoxicados con *Solanum glaucophyllum*. Trabajo de tesis de la Carrera del Doctorado en Ciencias Veterinarias. FCV. UNLP. Dirección: Portiansky EL y Barbeito CG. En realización.
- \* Fontana PA, Laguens G, Barbeito CG, DiGirolamo W, Costa EF, Coronato S, Gimeno EJ y Portiansky EL. Aspectos morfológicos y funcionales de poblaciones celulares del sistema inmune y de células asociadas al mismo, en bovinos intoxicados con *Solanum glaucophyllum* (Sg). Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas (SAIC, SAI, SAFE, SABiol., SABiof., SAN, SAF). Mar del Plata, 16 al 20-11-2004.
- \* Gimeno EJ, Costa EF, Gomar MS, Massone AR and Portiansky EL. Effects of plant induced hypervitaminosis D on cutaneous structure, cell differentiation and cell proliferation in cattle. *Journal of Veterinary Medicine A* 47, 201-211, 2000.
- \* Gimeno EJ. Pathological studies on calcinosis in ruminants due to plant poisoning. Philosophy Doctor (PhD) in Pathology Thesis. The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Tokyo, Japan. Finalizada 12-12-2001.
- \* Gimeno EJ, Portiansky EL, Gomar MS, Costa EF, Massone AR, Alonso CR, Dallorso ME and Barros SS. Calcinosis in ruminants due to plant poisoning: Contributions on the pathogenesis. In: *Poisonous Plants and Related Toxins*. Editores: T Acamovic, Scottish Agric. Coll. (SAC), UK, C S Stewart, Rowett Res. Inst., Aberdeen, and T W Pennycott, SAC, Ayr, UK. CAB-International: HB ISBN 0 85199 6140, pp. 84-89, 2004.
- \* Gomar MS. Efectos de la hipervitaminosis D vegetal en la diferenciación y proliferación celulares cutáneas, aórticas y pulmonares del conejo. Trabajo de tesis de la Carrera del Doctorado en Ciencias Veterinarias. FCV. UNLP. Dirección: Gimeno EJ y Portiansky EL. En etapa de finalización.
- \* Portiansky EL, Alonso CR, Costa EF and Gimeno EJ. Collagenous and elastic system fibres in the aorta of cattle poisoned by *Solanum glaucophyllum*. *Veterinary Record* 150, 42-45, 2002.