

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES CEREBRAIS EM OVINOS RECUPERADOS
DE POLIOENCEFALOMALACIA INDUZIDA POR AMPRÓLIO**

Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced
polioencephalomalacia

JULIANA PANIAGO LORDELLO DE PAULA

**CAMPO GRANDE, MS
2017**

JULIANA PANIAGO LORDELLO DE PAULA

**CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES CEREBRAIS EM OVINOS RECUPERADOS
DE POLIOENCEFALOMALACIA INDUZIDA POR AMPRÓLIO**

Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced
polioencephalomalacia

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Carloto Gomes

**CAMPO GRANDE, MS
2017**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos Vinicius e Maria Lucia, e meu irmão Felipe meu eterno agradecimento, por desde sempre me apoiarem em todas as escolhas feitas por mim e por me incentivarem a seguir o caminho na vida acadêmica. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu esposo José Geraldo que mesmo sabendo das dificuldades enfrentadas no início de um casamento sempre me incentivou e me encorajou para que eu fizesse o que eu queria, acreditando que eu seria capaz.

As minhas amigas e companheiras de pós-graduação, Paula e Rayane, que nos piores e melhores momentos estavam presentes me ensinando e me apoiando incessantemente. Obrigada por estarem sempre comigo.

Aos professores Cláudio, Ricardo, meu coorientador, e Danilo, meu orientador, por me orientarem e acreditarem em meu potencial, mesmo eu achando não ser capaz. Sempre disponíveis, atenciosos, pacientes e dispostos a ajudar. Vocês são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigada por estarem ao meu lado e acreditarem em mim.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Definição e etiologia	6
2.1.1 Deficiência de tiamina.....	7
2.1.2 Intoxicação por chumbo	7
2.1.3 Meningoencefalite por Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)	8
2.1.4 Intoxicação por cloreto de sódio associada a privação de água	9
2.1.5 Intoxicação por enxofre	10
2.1.6 Administração de amprólio.....	10
2.2 Diagnóstico	10
2.3 Tratamento.....	11
2.5 Cicatrização de lesões de PEM.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
ANEXOS	18
1. Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia, artigo aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	18
2. Aceite do artigo a ser publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira	18

1 INTRODUÇÃO

A polioencefalomalacia (PEM) é um termo descritivo utilizado para se referir à necrose da substância cinzenta do encéfalo (GOULD, 1998). No primeiro relato (JENSEN et al., 1956) ela era considerada uma doença que acometia bovinos e ovinos no Colorado, não tendo sido elucidada a causa, e em Wyoming associada à intoxicação por selênio. No Colorado era conhecida como intoxicação por forrageira e em Wyoming como "blind staggers".

A PEM, desde a década de 60, é atribuída à deficiência de tiamina (DAVIES et al., 1965; HENTSCHL et al., 1966; FENWICK, 1967; DALY, 1968). Tal suposição baseou-se na presença de taminases no rúmen de animais doentes, na recuperação dos doentes após o tratamento com tiamina e na reprodução experimental da doença com a administração de antagonista da tiamina como o amprólio (BOYD; WALTON, 1977). Sabe-se que hoje o quadro clínico de PEM em ruminantes está associado a diversas outras causas. (SANT'ANA et al., 2009a).

A PEM já foi relatada na região Nordeste (LIMA et al., 2005), Mato Grosso do Sul (ALMEIDA et al., 2013), São Paulo (NAKAZATO et al., 2000), Rio Grande do Sul (SANCHES et al., 2000), Minas Gerais (FERREIRA et al., 1986) e Mato Grosso (GRECCO et al., 2001). No Mato Grosso do Sul, a PEM representou a terceira patologia que mais acometeu o sistema nervoso de bovinos (RIBAS et al., 2013).

A condição não apresenta caráter sazonal e ocorre tanto na forma de surtos como de forma isolada (SANT'ANA et al., 2009c) em todo o país (MORO et al., 1994; NAKAZATO et al., 2000; SANCHES et al., 2000; LEMOS; RIET-CORREA, 2007). Na maioria dos surtos a morbidade e a mortalidade são menores ou iguais a 1% podendo atingir 14%. A letalidade varia de 43 a 100% dependendo do momento em que o tratamento é realizado (NAKAZATO, 2000; RIBAS et al., 2013).

O presente estudo objetivou examinar as lesões agudas em ovinos com PEM induzida por amprólio, correlacionando-as subsequentemente com os de ovinos recuperados da doença aguda. A recuperação em nossos casos foi induzida por tiamina ou espontaneamente e os ovinos foram examinados seis meses após a recuperação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição e etiologia

A PEM é considerada uma condição não infecciosa que acomete ruminantes principalmente com idade entre 6 a 18 meses, podendo acometer animais mais velhos (LIMA et al., 2005; RAMOS et al., 2005; SANT'ANA et al., 2009c), em condições de confinamento ou criação extensiva. Esta é uma enfermidade mundialmente dispersa já descrita no EUA (GABBEDY; RICHARDS, 1977), Inglaterra (DALY, 1968), Austrália (CHICK et al., 1981; BOURKE et al., 2005), Nova Zelândia (HILL; EBBETT, 1997), Espanha (RAMOS et al., 2003; RAMOS et al., 2005), Turquia (KUL et al., 2006), Índia (MAHAJAN et al., 2011), Canadá (COLONTINO; BUKMER, 1977), Japão (TSUKA et al., 2008), Argentina (CANTÓN et al., 2010). No Brasil a PEM foi observada nos estados do Mato Grosso do Sul (ALMEIDA et al., 2013), São Paulo (NAKAZATO et al., 2000), Rio Grande do Sul (SANCHES et al., 2000), Minas Gerais (FERREIRA et al., 1986), Mato Grosso (GRECCO et al., 2001), Paraíba e Pernambuco (LIMA et al., 2005).

Durante anos a etiologia tem sido atribuída à deficiência de tiamina (MORGAN, 1974) devido a presença de tiaminases no rúmen e a melhora dos animais afetados após tratamento com cloridrato de tiamina, entretanto a patogenia não está esclarecida (BARROS et al., 2006).

Diversas outras causas têm sido atribuídas à condição (SANT'ANA et al., 2009a), tais como mudanças bruscas na alimentação (RAMOS et al., 2005; KUL et al., 2006), intoxicação por chumbo (BARKER, 1987), meningoencefalite por Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) (RIET-CORREA et al., 2006), intoxicação aguda por *Phalaris* spp. (SOUSA; IRIGOYEN, 1999), intoxicação por cloreto de sódio associada a privação de água (PADOVAN, 1980), alimentação com melaço (HUNTER, 2012) e ingestão de levamizol e tiabendazol (LINKLATER et al., 1977). A PEM tem sido reproduzida experimentalmente através da administração de amprólio em bovinos (SANT'ANA et al., 2009a) e ovinos (SANT'ANA et al., 2009b) e com o excesso de enxofre na alimentação (GOULD et al., 1998, ROUSSEAU et al., 1991, CUNHA et al., 2010).

2.1.1 Deficiência de tiamina

A tiamina é uma vitamina hidrossolúvel presente no organismo dos animais de forma livre ou combinada na forma de tiamina pirofosfato. É popularmente conhecida como vitamina B1 e é encontrada em uma variedade de grãos de cereais e seus subprodutos (FRYE et al., 1991 ZEOULA; GERON, 2006). É uma substância essencial no metabolismo de glicídios, sendo a única via na qual os açúcares entram no metabolismo energético e na síntese de ácidos graxos. Além disso, auxilia na digestão através da produção do ácido clorídrico (ZEOULA; GERON, 2006).

Dietas com concentrações inadequadas de carboidratos e nitrogênio e com alto teor de sulfato proporcionam redução brusca do pH ruminal e quadros clínicos de acidose ruminal. Nesse caso, bactérias sintetizadoras de tiamina morrem e as produtoras de tiaminases se proliferam, ocasionando a diminuição desta substância no rúmen (ZEOULA; GERON, 2006) e consequente menor absorção (PASSLER et al., 2002; ZEOULA; GERON, 2006).

Uma das principais alterações que a deficiência de tiamina causa é a necrose da substância cinzenta - polioencefalomalacia. A função da tiamina no sistema nervoso central não é totalmente esclarecida, mas acredita-se que ela interfira nas reações que produzem energia no ciclo de Krebs e na síntese de glicose. Pelo fato da glicose ser a principal fonte de energia para o cérebro, a falta dessa pode interferir no funcionamento da bomba de sódio e potássio neuronal, resultando em maior quantidade de sódio e água no interior dos neurônios culminando em morte neuronal e PEM (PASSLER et al., 2002; ZEOULA; GERON, 2006).

2.1.2 Intoxicação por chumbo

A intoxicação por chumbo pode ocorrer em diversas espécies animais e é uma das etiologias que podem levar a PEM. Ela ocorre devido a ingestão acidental de fontes de compostos de chumbo ou ingestão de alimentos contaminados por este mineral (DRIEMEIER; BARROS, 2007; RADOSTITIS et al., 2012a).

As doses tóxicas são variadas entre as espécies, mas em bovinos a dose varia de 400-600mg/kg em bezerros e 600-800mg/kg em bovinos adultos. Na intoxicação aguda os principais órgãos afetados são fígado e rim e, menos comumente o cérebro. Os sinais de encefalopatia ocorrem devido às lesões vasculares com deposição de chumbo no endotélio dos capilares e produção de

edema. Na intoxicação crônica, o principal local de deposição do mineral são os ossos e não ocorrem sinais neurológicos (DRIEMEIER; BARROS, 2007).

Na forma aguda, os principais sinais clínicos são neurológicos e caracterizam-se por andar cambaleante, tremores musculares, incoordenação, opistótono, nistagmo, bruxismo, cegueira, fasciculação dos músculos da face, convulsões e morte (DRIEMEIER; BARROS, 2007; RADOSTITIS et al., 2012a).

Lesões macroscópicas são ausentes em casos agudos e no exame histopatológico observam-se lesões na substância cinzenta do córtex cerebral, com aumento no número de vasos sanguíneos e tumefação do endotélio, necrose neuronal e discretas áreas de malacia (BAKER, 1987; DRIEMEIER; BARROS, 2007; RADOSTITIS et al., 2012a).

2.1.3 Meningoencefalite por Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)

O Herpesvírus bovino-5 (BoHV-5) é um Alphaherpesvírus causador de meningoencefalite em bovinos. É uma doença infecciosa aguda que acomete animais de 6-7 meses até 3 anos de idade (RIET-CORREA et al., 1989; SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; GOMES et al., 2002; ELIAS et al., 2004) e já foi descrita experimentalmente também em ovinos e coelhos (BARROS et al., 2006).

A meningoencefalite por BoHV-5 está distribuída mundialmente (BARROS et al., 2006) e no Brasil é difundida principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; GOMES et al., 2002; ELIAS et al., 2004; SHARIFZADEH, et al., 2015).

Os animais infectados tornam-se portadores permanentes devido a capacidade do vírus em estabelecer infecção latente nos gânglios sensoriais, principalmente no gânglio trigêmeo. Condições de estresse como desmame, transporte, vacinações, mudanças de pasto e outros, são relacionadas à ocorrência de surtos por resultam em reativação viral (BARROS et al., 2006; HALFEN; RIET-CORREA, 2007). Esta doença pode ocorrer em surtos ou esporadicamente e a letalidade é alta podendo chegar a 100% (RIET-CORREA et al., 2006).

Os sinais clínicos se caracterizam principalmente por secreção nasal e ocular, febre, depressão, cegueira, pressão da cabeça contra objetos, cegueira, movimentos involuntários, nistagmo, opistótono, paralisia da língua, bruxismo, andar cambaleante, convulsões e morte (BARROS et al., 2006; RIET-CORREA et al., 2006).

A necropsia os achados macroscópicos podem estar ausentes ou quando observados são variáveis podendo haver hiperemia das leptomeninges, edema e malacia sendo essa mais frequente no córtex frontal. Esta lesão caracteriza-se inicialmente por tumefação e são amareladas ou hemorrágicas, se tornando gelatinosas e acinzentadas com a progressão da doença. Microscopicamente, há necrose neuronal, edema, tumefação do endotélio vascular, grande número de manguitos perivasculares e inclusões virais eosinofílicas intranucleares em astrócitos ou neurônios, sendo essas duas últimas lesões, as principais formas de diferenciar a infecção por BoHV-5 de outras causas de polioencefalomalacia (BARROS et al., 2006; HALFEN; RIET-CORREA, 2007).

2.1.4 Intoxicação por cloreto de sódio associada a privação de água

O cloreto de sódio (NaCl) é um dos minerais mais requisitados pelos animais. É o mais utilizado em suplementos e é palatável (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Em animais domésticos, a intoxicação por sal pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma indireta é de ocorrência incomum e caracteriza-se por ingestão excessiva de sal principalmente devido a maior salinidade da água ingerida ou acesso irrestrito a suplementos com esse composto. Nesse caso, os sinais clínicos são digestivos e neurológicos e caracterizam-se por poliúria, diarreia, dor abdominal, paresia e cegueira (SUMMERS et al., 1995; CANTILE; YOUSSEF, 2016).

A forma direta é de ocorrência mais comum em animais domésticos, principalmente suínos e aves, sendo mais esporádica em ovinos e bovinos, e envolve um desequilíbrio entre a ingestão de sal e a disponibilidade de água. Os casos ocorrem, tipicamente, quando o acesso a água é reestabelecido após um período de limitação ou total privação de forma que os animais usualmente ingerem água excessivamente. Dessa forma, essa síndrome é conhecida como intoxicação por sal, privação por água ou intoxicação por água (SUMMERS et al., 1995). Clinicamente, há cegueira, pressão da cabeça contra objetos, ataxia, agressividade. As lesões microscópicas variam de edema cerebral a malacia cortical (SUMMERS et al., 1995; CANTILE; YOUSSEF, 2016).

2.1.5 Intoxicação por enxofre

O enxofre (S) é um mineral presente nos alimentos como um dos componentes da proteína. Este mineral é deficiente no solo e consequentemente nas pastagens, e devido a sua importância, é essencial que se faça sua suplementação. Quando ocorre deficiência de S, há queda na produção de proteína microbiana e acúmulo de ácido láctico no rúmen (PEDREIRA; BERCHIELLI, 2006). A intoxicação ocorre quando o animal consome através de pastagem, concentrado, sal mineral e água, níveis maiores que 4% de S (LE MOS; RIET-CORREA, 2007).

Quando ocorre a intoxicação, o animal apresenta depressão, dor abdominal, tremores musculares, diarreia escura, forte odor de sulfeto de hidrogênio na respiração, cegueira, pressão da cabeça contra objetos, ataxia, decúbito, convulsões e morte (RADOSTITIS et al., 2012b; LUTNICKI et al., 2014). A necropsia as lesões não são aparentes e na microscopia observa-se malacia, necrose neuronal e manguitos perivasculares linfocitários (LUTNICKI et al., 2014).

2.1.6 Administração de amprólio

Substâncias antitiamínicas são muito comuns na natureza e incluem antagonistas estruturalmente semelhantes ou diferentes. Compostos sintéticos como piritiamina, oxitiamina e amprólio são antagonistas semelhantes a tiamina pertencentes a classe dos derivados quaternários. Esses compostos inibem competitivamente a tiamina, interferindo em seu metabolismo (ROGERS, 1962; FRYE et al., 1991).

O amprólio é um anticoccidiano antagonista da tiamina, ou seja, é uma substância que compete com a tiamina inibindo sua absorção intestinal e bloqueando a fosforilação da vitamina (ROGERS, 1962). LOWE e DUNLAP (1972) descobriram que níveis elevados de amprólio (consideravelmente acima dos níveis necessários para prevenir a coccidiose) poderiam produzir os sinais clínicos e as lesões histológicas da PEM secundárias à deficiência dessa vitamina.

2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da PEM deve ser baseado nos sinais clínicos neurológicos e nos achados histopatológicos que são semelhantes nas diferentes espécies e nas

diferentes etiologias. Os principais sinais clínicos são caracterizados por afastamento do rebanho, rigidez dos membros, cegueira, incoordenação, andar cambaleante ou em círculos, tremores musculares, paralisia da língua, opistótono, nistagmo, estrabismo, depressão, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, ataxia, bruxismo, sialorreia e convulsões (ROUSSEAU et al., 1991; GONÇALVES et al., 2001; LIMA et al., 2005; DORE; SMITH, 2016). A cegueira é o sinal clínico mais característico da PEM e está presente em quase 100% dos casos, no entanto não é patognomônico já que é observado em outras doenças nervosas como abscesso da pituitária (LORETTI et al., 2003) e raiva (RIBAS et al., 2013).

Macroscopicamente observa-se congestão e tumefação com achatamento das circunvoluções cerebrais, podendo ocorrer áreas multifocais amolecidas e amareladas e edema encefálico levando ao deslocamento do cerebelo para dentro do forame magno (SANT'ANA et al., 2009a,b; NOGUEIRA et al., 2010; RIBAS et al., 2013). Em casos de indução de PEM por amprólio pode-se observar hemorragias na região do lobo parietal e occipital e mesencéfalo, e dependendo da dosagem utilizada pode ocorrer síndrome hemorrágica (MORGAN, 1974; SANT'ANA et al., 2009a; NOGUEIRA et al., 2010). Em intoxicações por *Phalaris angusta* há coloração verde-azulada no tálamo e mesencéfalo (SOUSA; IRIGOYEN, 1999).

Histologicamente, o córtex telencefálico apresenta necrose neuronal (neurônios vermelhos), frequentemente com distribuição laminar. Há também graus variáveis de edema perivascular e perineuronal, tanto no córtex como na substância branca imediatamente subjacente, e hipertrofia do endotélio (SEIMIYA et al., 1991; NAKAZATO et al., 2000; SANT'ANA et al., 2009a,b). Em animais acometidos por BoHV-5, além das lesões já citadas, observa-se acúmulos perivasculares de linfócitos e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicas em astrócitos (RIET-CORREA et al., 2006). Intoxicação por *Phalaris angusta* observa-se pigmento finamente granular, marrom-amarelado, no citoplasma de neurônios (SOUSA; IRIGOYEN 1999). Quando os animais são induzidos por enxofre ou ocorre naturalmente a intoxicação, observam-se hemorragias nos segmentos ventrais do encéfalo (CUNHA et al., 2010).

2.3 Tratamento

Em casos graves a terapia consiste em reposição imediata de tiamina, e uma recomendação comum é a administração inicial de 10 mg/kg por injeção intravenosa

(IV). Nos casos em que a doença está no início, a terapêutica com cloridrato de tiamina deve ser continuada durante vários dias com 10 mg/kg administrados a cada 3 a 6 horas por via subcutânea ou intramuscular. A melhora clínica é frequentemente observada em 6 a 24 horas e a frequência de administração de tiamina pode ser reduzida lentamente. Em animais com deficiência grave, foi recomendado o tratamento do edema cerebral utilizando manitol 20% (1 a 2 g/kg IV), seguido de dexametasona 3 horas mais tarde (1 mg/kg IV). A administração oral de cloridrato de tiamina (1 g) foi recomendada quando as deficiências são causadas por tiaminases ou em situações de surto em rebanho, nas quais outros animais são susceptíveis de serem afetados. As administrações orais de tiamina também podem ser benéficas em casos de acidose ruminal aguda (KARAPINAR et al., 2008; PASSLER et al., 2002).

2.5 Cicatrização de lesões de PEM

Animais acometidos por polioencefalomalacia com ou sem manifestação de sinais clínicos apresentam lesões características no cérebro de edema telencefálico, necrose neuronal, migração de células gitter, astrócitos reativos, hiperplasia e hipertrofia de endotélio (VANDEVELDE et al., 2012).

Lesões cerebrais crônicas podem estar presentes, mas muitas vezes serão clinicamente silenciosas ou os animais podem permanecer cegos e com debilidade mental (MAYHEW, 2009). Há descrição de um caso em um equino que morreu algum tempo após recuperar-se de sinais neurológicos e que, microscopicamente, apresentava lesões crônicas semelhantes de PEM (MAYHEW, 2009). Em animais que morrem e naqueles que se recuperam, o tecido morto é removido e substituído pela micróglia e em áreas onde a substância cinzenta está necrosada há separação da substância branca por um espaço vazio semelhante a uma cicatriz formada pela ligação com os astrócitos proliferados (CANTILE; YOUSSEF, 2016).

252 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 253 ALMEIDA, T.L.; BRUM, K.B.; LEMOS, R.A.A.; LEAL, C.R.B.; BORGES, F.A. 2013.
 254 Doenças de ovinos diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica Animal da
 255 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (1996-2010). **Pesquisa Veterinária**
 256 **Brasileira**, 33(1):21-29.
- 257 BARKER, J.C. 1987. Lead Poisoning in Cattle. **Veterinary Clinics of North America:**
 258 **Food Animal Practice**, 3(1):137-147.
- 259 BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. 2006. Doenças
 260 carenciais e metabólicas, p. 166-171. In: BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA,
 261 I. S.; LEMOS, R. A. A. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**, 1st ed.,
 262 Helianthus, Rio de Janeiro.
- 263 BOURKE, C.A.; COLEGATE, S.M.; RENDELL, D.; BUNKER, E.C.; KUHN, R.P. 2005.
 264 Peracute ammonia toxicity: A consideration in the pathogenesis of *Phalaris aquatica*
 265 “Polioencephalomalacia-like sudden death” poisoning of sheep and cattle. **Australian**
 266 **Veterinary Journal**, 83(1):168-171.
- 267 BOYD, J.W.; WALTON, J.R. 1977. Cerebrocortical necrosis in ruminants: An attempt
 268 to identify the source of thiaminase in affected animals. **Journal of comparative**
 269 **pathology**, 87(4):581-589.
- 270 CANTILE C. & YOUSSEF S. 2016. Nervous system, p. 314–315. In: Maxie M.G. (Ed.),
 271 **Jubb, Kennedy, and Palmer’s Pathology of Domestic Animals**, 6th Ed., vol. 1,
 272 Elsevier, St Louis.
- 273 CANTÓN, G.; CAMPERO, C.; VILLA, M.; ODRIOZOLA, E. 2010. Acute and chronic
 274 nervous signs in cattle associated with *Phalaris angusta* poisoning in Argentina.
 275 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(1):63-66.
- 276 CHICK, B.F.; CARROLL, S.N.; KENNEDY, C.; MCCLEARY, B.V. 1981. Some
 277 biochemical features of an outbreak of polioencephalomalacia in sheep. **Australian**
 278 **Veterinary Journal**, 57(5):251-252.
- 279 COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.;
 280 SOUZA, M.A.; Oliveira, J.A.F.; CARON, L. 2002. Meningoencefalite necrosante em
 281 bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência**
 282 **Rural**, 32(2):293-298.
- 283 COLONTINO, J.; BULMER, W.S. 1977. Polioencephalomalacia in a dairy cow.
 284 **Canadian Veterinary Journal**, 18(12):356-357.
- 285 CUNHA, P.H.J.; BANDARRA, P.M.; DIAS, M.M.; BORGES, A.S.; DRIEMEIER D.
 286 2010. Surto de polioencefalomalacia por ingestão excessiva de enxofre na dieta em
 287 bezerros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(8):613-617.
- 288 DALY, F.J. 1968. Polioencephalomalacia: Response to thiamine treatment in sheep
 289 and a cow. **Australian Veterinary Journal**, 44(8):394-394.
- 290 DAVIES, E.T.; PILL, A.H.; COLLINGS, D.F.; VENN, J.A.J.; BRIDGES, G.D.; MCKAY,
 291 A. 1965. Cerebro cortical necrosis in calves. **Veterinary Record**, 77.

- DORE, V.; Smith, G. 2016. Cerebral Disorders of Calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, p.1-15.
- DRIEMEIER, D.; BARROS, C.S.L. 2007. Intoxicação por chumbo, p.55-59. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e equídeos**, 2nd ed., Vol. 2. Pallotti, Santa Maria.
- ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. 2004. Bovine herpesvirus type-5 meningoencephalitis and malacia: histological lesions distribution in the central nervous system of naturally infected cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 24(3):123-131.
- FENWICK, D.C. 1967. Polioencephalomalacia of sheep: response to thiamine in a single case. **Australian Veterinary Journal**, 43(10):484-484.
- FERREIRA, F.A.; COELHO, H.E.; BASTOS, J.E.D. 1986. Polioencefalomalacia em bovinos no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 38(5):693-700.
- FRYE, T.M.; WILLIAMS, S.N.; GRAHAM, T.W. 1991. Vitamin Deficiencies in Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 7(1):217-275.
- GABBEDY, B.J.; RICHARDS, R.B. 1977. Polioencephalomalacia of sheep and cattle. **Australian Veterinary Journal**, 53(1):36-38.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, E.F.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. 2002. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 54(2):217-220.
- GONÇALVES, R.C.; VIANA, L.; SEQUEIRA, J.L.; BANDARRA, E.P.; CHIACCHIO, S.B.; KUCHEMBUCK, M.R.G. 2001. Aspectos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos da polioencefalomalacia em bovinos, na região de Botucatu, SP. **Veterinária Notícias**, 7(1):53-57.
- GOULD, D.H. 1998. Polioencephalomalacia. **Journal Animal Science**, 76(1):309-314.
- GRECCO, F.B.; SCHEIN, F.; DANTAS, A.F.M. 2001. Polioencefalomalacia em bovinos no Estado de Mato Grosso. **10º Enapave, Pirassununga**, p. 121. (Resumo)
- HALFEN, D.C.; RIET-CORREA, F. 2007. Infecções por herpesvirus bovino-1 e herpesvírus bovino-5, p.126-134. In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**, 3rd ed., vol. 1, Fernovi, Santa Maria.
- HENTSCHL, A.F.; WALTON, J.F.; MILLER, E.W. 1966. Treatment of bovine polioencephalomalacia with vitamin B complex. **Modern Veterinary Practice Journal**, 47(7):72-74.
- HILL, F.I.; EBBETT, P.C. 1997. Polioencephalomalacia in cattle in New Zealand fed chou moellier (*Brassica oleracea*). **New Zealand Veterinary Journal**, 45(1):37-39.
- HUNTER, R.A. 2012. High-molasses diets for intensive feeding of cattle. **Animal Production Science**, 52(9):787-794.

- JENSEN, R.; GRINER, L.A.; ADAMS, O.R. 1956. Polioencephalomalacia of cattle and sheep. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, 129(1):311-321.
- KARAPINAR, T.; DABAK, M.; KIZIL, O.; BALIKCI, E. 2008. Severe Thiamine Deficiency in Sheep with Acute Ruminal Lactic Acidosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 22(3):662-665.
- KUL, O.; KARAHAN, S.; BASALAN, M.; KABAKCI, N. 2006. Polioencephalomalacia in Cattle: A Consequence of Prolonged Feeding Barley Malt Sprouts. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, 53(3):123-128.
- LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F. 2007. Polioencefalomalacia, p.658-670. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**, 2nd ed., Vol. 2. Pallotti, Santa Maria.
- LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I.M.; DANTAS, A.F.M.; MEDEIROS, J.M.; JÚNIOR, G.S. 2005. Polioencefalomalacia em caprinos e ovinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 25(1):9-14.
- LINKLATER, K.A.; DYSON, D.A.; MORGAN, K.T. 1977. Faecal thiaminase in clinically normal sheep associated with outbreaks of polioencephalomalacia. **Research in Veterinary Science**, 22(3):308-12.
- LOEW, F.M.; DUNLOP, R.H. 1972. Induction of thiamin inadequacy and polioencephalomalacia in adult sheep with amprolium. **American Journal of Veterinary Research**, 32(11):2195.
- LORETTI, A.P.; ILHA, M.R.S.; RIET-CORREA, G.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; BARROS, C.S.L. 2003. Síndrome do abscesso pituitário em bezerros associada ao uso de tableta nasal para desmame interrompido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 23(1):39-46.
- LUTNICKI, K.; MADEJ, E.; RIHA, T.; KUREK, L. 2014. Polioencephalomalacia in ruminants caused by excessive amount of sulphur - a review. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, 58(2):321-326.
- MAHAJAN, S.; AGRAWAL, R.; RASHID, S.M. 2011. Diagnosis and management of polioencephalomalacia in indian buffaloes under farm conditions. **Buffalo Bulletin**, 30(1):6-9.
- MAYHEW, J. 2009. Interpretation of signs of brain and cranial nerve disease, p. 18. In: Ibid (Ed.) **Large Animal Neurology**, 2nd ed. Wiley Blackwell, Iowa.
- MORGAN K.T. 1974. Amprolium poisoning of preruminant lambs. An ultrastructural study of the cerebral malacia and the nature of the inflammatory response. **The Journal of Pathology**, 112(4):229-236.
- MORO, L.; NOGUEIRA, R.H.G.; CARVALHO, A.U.; MARQUES, D.C. 1994. Relato de três casos de polioencefalomalacia em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 46(4):409-416.
- NAKAZATO, L.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F. 2000. Polioencefalomalacia em bovinos nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 20(3):119-125.

- 374 NOGUEIRA, A.P.A.; SOUZA, R.I.C.; SANTOS, B.S.; PINTO, A.P.; RIBAS, N.L.K.S.;
375 LEMOS, R.A.A.; SANT'ANA, F.J.F. 2010. Polioencefalomalacia experimental induzida
376 por amprólio em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(8):631-636.
- 377 PADOVAN, D. 1980. Polioencephalomalacia associated with water deprivation in
378 cattle. **The Cornell veterinarian**, 70(2):153-159.
- 379 PASSLER, T.; WALZ, P.H.; PUGH, D.G. 2002. Diseases of the Neurologic System,
380 p.378-380. In: PUGH, D. G.; BAIRD, A. N. **Sheep and Goat Medicine**, 2nd ed.,
381 Saunders, Missouri.
- 382 PEDREIRA, M.S.; BERCHIELLI, T.T. 2006. Minerais, p.337. In: BERCHIELLI, T.T.;
383 PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**, 2nd ed. Funep, Jaboticabal.
- 384 RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. 2012a. Doenças
385 causadas por substâncias químicas inorgânicas e produtos químicos utilizados nas
386 fazendas, p.1446-1448. In: Ibid (Eds.) **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças**
387 **dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**, 9th ed, Guanabara Koogan, Rio
388 de Janeiro.
- 389 RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. 2012b. Doenças
390 causadas por substâncias químicas inorgânicas e produtos químicos utilizados nas
391 fazendas, p.1450. In: Ibid (Eds.) **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos**
392 **bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**, 9th ed., Guanabara Koogan, Rio de
393 Janeiro.
- 394 RAMOS, J.J.; MARCA, C.; LOSTE, A.; JALÓN, J.A.G.; FERNÁNDEZ, A.; CUBEL, T.
395 2003. Biochemical changes in apparently normal sheep from flocks affected by
396 polioencefalomalacia. **Veterinary Research Communications**, 27(2):111-124.
- 397 RAMOS, J.J.; FERRER, L.M.; GARCÍA, L.; FERNÁNDEZ, A.; LOSTE, A. 2005.
398 Polioencephalomalacia in adult sheep grazing pastures with prostrate pigweed. **The**
399 **Canadian Veterinary Journal**, 46(1):59-61.
- 400 RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C; VALENÇOELA, R.A.; GOUVEIA,
401 A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. 2013. Doenças do sistema nervoso
402 de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,
403 33(10):1183-1194.
- 404 RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M. D. C. 1989.
405 Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por Herpes
406 Vírus Bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 9(1/2):13-6.
- 407 RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.;
408 CERQUEIRA, V.D.; BRITO, M.F.; RIET-CORREA, F. 2006. Meningoencefalite e
409 polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará.
410 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 26(1):44-46.
- 411 ROGERS, E.F. Thiamine Antagonists. 1962. **Annals of the New York Academy of**
412 **Sciences**, 98:412-429.
- 413 ROUSSEAU, C.G.; OLKOWSKI, A.A.; CHAUVET, A.; GOONERATNE, S.R.;
414 CHRISTENSON, D.A. 1991. Ovine Polioencephalomalacia Associated With Dietary
415 Sulphur Intake. **Journal of Veterinary Medicine**, 38(1):229-239.

- SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.A. 1998. Meningoencephalitis in cattle caused by bovine herpesvirus-5 in Mato Grosso do Sul and São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 18(2):76-83.
- SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 20(3):113-118.
- SANT'ANA, F.J.F.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; TOGNI, M.; TESSELE, B.; BARROS, C.S.L. 2009a. Polioencefalomalacia em ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29(9): 681-694.
- SANT'ANA, F.J.F.; NOGUEIRA, A.P.A.; SOUZA, R.I.C.; CARDINAL, S.G.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. 2009b. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(9):747-752.
- SANT'ANA, F.J.F.; RISSI, D.R.; LUCENA, R.B.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; BARROS, C.S.L. 2009c. Polioencefalomalacia em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões no encéfalo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(7):487-497.
- SEIMIYA, Y.; ITOH, H.; OHSHIMA, K. 1991. Brain lesions of lead poisoning in a calf. **Journal of Veterinary Medicine Science**, 53(1):117-119.
- SHARIFZADEH, A.; NAMAZI, M.J.; MOKHTARI-FARSANI, A.; DOOSTI, A. 2015. Bovine herpesvirus type 5 in semen samples from bulls in Iran. **Archives of Virology**, 160(1):235-239.
- SOUSA, R.S.; IRIGOYEN, L.F. 1999. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 19(3/4):116-122.
- SUMMERS, B.A.; CUMMINGS J.F.; de LAHUNTA A. 1995. Intoxications and toxicoinfectious diseases, p.254-255. In: Ibid (Eds.) **Veterinary Neuropathology**, Mosby, St. Louis.
- TSUKA, T.; TAURA, Y.; OKAMURA, S.; TAMURA, H.; OKAMOTO, Y.; OKAMURA, Y.; MINAMI, S. 2008. Imaging diagnosis-Polioencephalomalacia in a calf. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, 49(2):149-151.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. 1999. Sodium and chlorine, p.185-212. In: Ibid. (Eds), **The Mineral Nutrition of Livestock**, 3rd ed. CABI Publishing, Oxon.
- VANDEVELDE, M.; HIGGINS, R.J.; OEVERMANN A. 2012. Polioencephalomalacia (PE) or cerebrocortical necrosis (CCN), p.108-112, In: Ibid (Eds.) **Veterinary Neuropathology**, Wiley-Blackwell, Iowa.
- ZELOULA, L.M.; GERON, L.J.V. 2006 In: Vitaminas. p.375-377. Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. In: **Nutrição de ruminantes**, 2nd ed. Funep, Jaboticabal.

ANEXOS

456

457

- 458 1. Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced
459 polioencephalomalacia, artigo aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária
460 Brasileira
- 461 2. Aceite do artigo a ser publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira



Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID	PVB-5455.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	23-May-2017
Complete List of Authors:	Paula, Juliana; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Leal, Paula; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Pupin, Rayane; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Lima, Stephanie; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Santos, Alexandre; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Souza, Marcos Antonio; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Amaral de Lemos, Ricardo Antonio; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Gomes, Danilo; UFMS, Laboratório de Patologia Veterinária
Keyword:	Small ruminant diseases, Brain, Polioencephalomalacia, Healing of central nervous tissue

SCHOLARONE™
Manuscripts

Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia¹

Juliana P.L. Paula², Paula V. Leal², Rayane C. Pupin², Stephanie C. Lima², Marcos A. S. Souza³, Alexandre A. Santos³, Ricardo A.A. Lemos³ and Danilo C. Gomes^{3*}

ABSTRACT.- Paula J.P.L., Leal P.V., Pupin R.C., Lima S.C., Souza M.A.S, Santos A.A., Lemos R.A.A. & Gomes D.C. 2017. [Healing of brain lesions in seep recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia.] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil. E-mail: danilo.gomes@ufms.br

To evaluate the outcome of acute lesions in the brains of sheep that completely clinically recover from acute polioencephalomalacia (PEM), ten sheep were used in this experiment. Eight of those sheep received varying doses of amprolium to induce PEM. Four sheep were treated intramuscularly with 40mg/kg/body weight with thiamine to allow recovery and four sheep were left untreated. Two control sheep did not receive either amprolium or thiamine and were kept along with the other eight sheep for the duration of the experiment. Except for the two drugs, the diet and water source were the same for the ten sheep. Two sheep receiving high daily doses of amprolium and one sheep receiving a lower dose had acute deaths and developed acute brain lesions consisting of neuronal laminar cortical necrosis (red neurons), edema, reactive astrocytes, swollen endothelial cells and gitter cells infiltration. Four sheep that recovered from lower doses of amprolium-induced PEM after being treated with thiamine and another one that recovered spontaneously were euthanatized six months after clinical recovery and had gross changes consisting of segmental absence of cortical tissue. Histologically these segmental cortex-deprived areas corresponded to quasi-empty spaces where only

¹ Received on...

Accepted on...

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil.

³ FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS. *Corresponding author: danilo.gomes@ufms.br

vessels and gitter cells existed. No changes were seen in the brains of the two control sheep.

INDEX TERMS: Small ruminant diseases, brain, polioencephalomalacia, healing of central nervous tissue

RESUMO.- [Cicatrização das lesões cerebrais em ovinos recuperados de polioencefalomalacia induzida por amprólio]. Para avaliar a evolução das lesões agudas no cérebro de ovinos que se recuperam clinicamente de polioencefalomalacia aguda (PEM), dez ovinos foram usados neste experimento. Oito desses ovinos receberam doses variáveis de amprólio para induzir PEM. Quatro ovinos foram tratados intramuscularmente com 40mg/kg/peso corporal de tiamina para permitir a recuperação, e outros quatro ficaram sem tratamento. Dois ovinos controles não receberam amprólio nem tiamina e foram mantidos com os outros oito ovinos durante a duração do experimento. Exceto pelas duas drogas, a dieta e a fonte de água eram as mesmas para os dez ovinos. Dois ovinos que receberam doses diárias altas de amprólio, e um que recebeu doses menores, tiveram mortes agudas e desenvolveram lesões cerebrais constituídas por necrose neuronal laminar cortical (neurônios vermelhos), edema, tumefação de células endoteliais, astrócitos reativos, tumefação de células endoteliais e infiltração por células *gitter*. Quatro ovinos que se recuperam da PEM induzida por amprólio, após tratamento com tiamina, e um outro que se recuperou espontaneamente, permaneceram clinicamente normais e foram submetidos a eutanásia seis meses após a recuperação clínica. Na necropsia, apresentavam alterações macroscópicas caracterizadas por ausência segmentar de tecido corticocerebral. Histologicamente, essas áreas privadas de tecido cortical consistiam de espaços praticamente vazios onde apenas vasos e células *gitter* eram vistos. Não foram encontradas alterações no encéfalo das duas ovelhas controle.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de pequenos ruminantes, cérebro, polioencefalomalacia, cicatrização do tecido do sistema nervoso.

INTRODUCTION

Polioencephalomalacia (PEM) is a morphologic descriptive term for necrosis with softening of the encephalic gray matter (Vandevelde et al. 2012). Although several causes have been described for this condition in several species, the term is commonly used to refer a disease in cattle and sheep attributed mainly to sulfur poisoning (Cunha et al. 2010) and/or thiamin deficiency (Sant'Ana & Barros 2010) and that has been successfully treated with parenteral thiamine (Daly 1968, Mendes et al. 2007). Sulphur poisoning related PEM may have a relationship with thiamine deficiency through the process of sulfite cleaving thiamine (Miller & Zachary et al. 2017).

Amprolium is a thiamine analog coccidiostat drug that blocks thiamine uptake in coccidian and has been used also as an experimental tool in the induction of PEM in ruminants (Morgan 1974, Spicer & Horton 1981, Sant'Ana et al. 2009).

Although there are reports on the residual brain lesions of ruminants recovering from spontaneous PEM (Jensen et al. 1956) there are no detailed observations of the evolution of the lesions, as the brains of recovered animals are, for obvious reasons, rarely examined.

This study examined the acute lesions in sheep with amprolium-induced PEM, and subsequently correlates them with those of sheep recovered from the acute phase of amprolium-induced PEM. The recovery in our cases was either thiamine-induced or spontaneous and sheep were examined six months after recovery.

MATERIAL AND METHODS

Ten sheep were used in this experiment. Their mean ages and weights were respectively 6-month-old and 19kg. At the beginning of the experiment, they were dewormed and identified by sequential numbers from 1-10.

During a seven-day adaptation period and throughout the experiment the ten sheep were kept indoors in five stalls of 1.5x2m (two sheep per stall). They were offered free access to water and 2% of their body weight in dry matter consisting of corn silage and ovine commercial ration. A clinical exam was performed daily in each sheep.

In order to induce PEM, two sheep – Sheep 1 and 2 – received amprolium⁴ at daily doses of 1,000mg/kg/body weight (bw) for 5 and 10 days respectively. As this high dosage of amprolium induced a disease too acute to be treated which included gastrointestinal disturbances, additionally six sheep – Sheep 3-8 – were given amprolium at daily doses of 500mg/kg/bw for respectively 49, 20, 22, 28, 30, and 31 days. Sheep 4-6 and were treated with on single intramuscular (IM) dose of 40mg/kg/bw of thiamine⁵ and Sheep 8 received three IM doses of 40mg/kg/bw of thiamine. Sheep 3 and 7 were left untreated. The criterium to determine the time of implementation of the thiamine treatment was the day the sheep showed unequivocal neurological signs including blindness, opisthotonus, and recumbency. Two control sheep did not receive either amprolium or thiamine and were kept along with the other eight sheep for the duration of the experiment. Except for the two drugs, the diet and water source were the same for the ten sheep. Sheep either died spontaneously or were euthanatized (including the two controls) at the end of the experiment. All ten sheep were necropsied and fragments of several organs were processed for histopathology. Data of the experiment are summarized in Table 1. The experiment was approved by Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul that regulates the use of experimental animals, and registered under the protocol no. 780/2016.

RESULTS

Sheep 1 and 2 were found dead respectively 5 and 10 days after the start of the experiment. They did not develop clear-cut neurological signs and died too acutely preventing the implementation of treatment. The only clinical signs observed were anorexia and marked diarrhea.

Sheep 3-8 developed neurological clinical signs compatible with PEM that develop 11-47 days after the start of the experiment (Table 1). Those signs included tremors, opisthotonus (Fig.1), blindness, recumbency, and paddling. The four thiamine-treated sheep (Sheep 4-6, and 8) recovered from clinical signs within 6-10 hours of treatment and remained clinically normal for 6 months after

⁴ Amprobase, Saúde Animal, Ltda. Av. Emílio Marconato 100, Galpão A3, Jaraguá, SP. CEP 13820-000, www.farmabase.com.br

⁵ Monovin B1. Uso veterinário. Laboratório Bravet Ltda. Rua Visconde de Santa Cruz, 276, Rio de Janeiro, RJ. CEP 20950-340

recovery when they were euthanatized for necropsy. One untreated sheep (Sheep 7) recovered spontaneously after a neurological clinical disease of two-week duration and was euthanatized 6 months after recovery. Controls (Sheep 9 and 10) were euthanatized at the end of the experiment immediately after the last experimental sheep was euthanatized.

Significant necropsy findings were restricted to the cerebral cortex of Sheep 1-8. No significant necropsy findings were present in the two control sheep.

The brains of Sheep 1-3 were moderately swollen as detected by flattened gyri and narrowing of sulci. (Fig.2). Additionally Sheep 3 had hemorrhages visible at cut surface of the brain stem Sheep 4-8 that survived for longer periods had similar gross lesions in the brain which consisted of segmental loss of cerebrocortical tissue. These areas of cortical loss were characterized by cavitations (Fig.3) in the cortical gray matter.

Microscopic examination of the brain of Sheep 1-3 revealed acute lesions characterized by edema, acidophilic (red) neuronal laminar necrosis and hypertrophy of capillary endothelial cells, infiltration of foamy macrophages in the neuropil and perivascular spaces, and cleavage of the deeper lamina of the cortical brain (Fig.4). The red neurons developed and angular shrunk silhouette and dark pyknotic nucleus. Five Sheep (Sheep 4-8) had similar changes of segmental decortication. In these segmental areas, the normal cortical tissue has vanished (Fig.5) and was replaced by only two elements: blood vessels (and some associated connective tissue) and gitter cells (Fig.6). No histological lesions were observed in the controls (Sheep 9 and 10).

DISCUSSION

Sheep with amprolium-induced PEM in this experiment either died or were euthanatized in two periods after the onset of clinical signs: 2-5 days (three cases) and six months (5 cases). Hereafter we shall refer to these stages as acute and healing (cured). Gross lesions were limited to cerebral cortex. The histopathological examination of the brains of affected sheep at these two periods allows us to speculate on the time frame of lesion development.

The time of development and morphological constituents of acute PEM lesions in the three sheep of this study conforms with which is described in a recent

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

edition of a veterinary pathology reference book (Miller & Zachary 2017): two days after onset of disease, the surface of the brain was edematous with flattening of cerebrocortical gyri and narrowing of sulci. The microscopic lesions consisted of laminar necrosis (red neurons) of the deeper lamina of the cerebral cortex, edema, and prominence of small blood vessels, infiltration of foamy macrophages in the neuropil and perivascular spaces and separation of the deeper lamina of the cortical brain. The resolution (cure, healing) of this lesions could be appreciated in the brain of five sheep examined after they recovered either spontaneously or due to thiamine treatment. The typical neurological clinical signs of PEM developed by these sheep allow us to infer that they developed acute disease and lesions as the ones just described above, and that the lesion characterized by a segmental absence of brain cortex found grossly and microscopically in these cases represents the healing process of the active lesions. The dead neurons, their processes, and dead glial elements are phagocytosed by monocytes coming from the blood (mostly) and by resident microglial cells which engorge becoming foamy macrophages, known as gitter cells, which find their way out of the brain carrying their load of dead material mainly through perivascular space (Vandevelde et al 2012). The healed lesions of these five sheep were of cavities within which only gitter cells and vascular remains could be observed. Most likely, the decline and disappearance of brain edema was determinant in improving the clinical status.

Although it is stated that ruminants recovering from PEM “become partially decorticate and remain blind and stupid” (Cantile & Youssef 2016) this was not the case with the five recovered sheep in the current experiment: a fortnight or less after treatment, in spite of loss of extensive areas of cerebral cortex, sheep were clinically normal and remained so for the six months before euthanasia. Although this is difficult event to equate, it is not unheard of regarding domestic animals. Sometimes, quite large chronic brain lesions will be present but be clinically silent whereas smaller but acute lesions do often have a clinical expression (Mayhew 2009). This fact is more likely related to the anatomical site of the lesions and probably sheep can do well even with extensive loss of their cerebral cortex but would succumb to smaller lesions in the brain stem.

Our results seem to point out that 500mg/kg/bw is an adequate dose to systematically induce PEM in sheep without the risk of developing a too acute

disease complicated with gastrointestinal signs, such as diarrhea (Morgan et al 1975). This information could be useful for further experiments. On the other hand, although the number of cases in this experiment are too limited to be conclusive, the treatment with thiamine (40 mg/kg/bw) seem to be adequate to halt the progression of the disease. More studies though are necessary to establish a model for disease production and treatment.

This study demonstrated that healed cerebrocortical lesions of PEM although extensive are compatible with life and clinical normalcy in sheep and that spontaneous recovery may occur. This may have some importance in the routine diagnosis of brain diseases in ruminants, since the adequate significance can be attributed to residual lesion such as these when found at necropsy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento - do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CNPq e Grant 15/2014 - PRONEM -MS - Grant 59/ 300.126/2015) and by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento - do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CAPES 05/2014 e PVMS - 59/300.032/2015).

REFERENCES

Cantile C. & Youssef S. 2009. Nervous system: Polioencephalomalacia of ruminants, 309–312 In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer’s Pathology of Domestic Animals, 6th Ed., vol. 1, Elsevier, St Louis.

Cunha P.H.J., Bandarra P.M., Dias M.M., Borges A.S. & Driemeier D. 2010. Surto de polioencefalomalacia por ingestão excessiva de enxofre na dieta em bezerros no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30:613-617.

Daly F.J. 1968. Polioencephalomalacia: response to thiamine treatment in sheep and a cow. *Aust. Vet. J.* 44:394.

Jensen R., Griner L.A. & Adams O.R. 1956. Polioencephalomalacia of cattle and sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 129:311–321.

Mayhew J. 2009. Interpretation of signs of brain and cranial nerve disease, p. 18. In: Ibid (Ed.) *Large Animal Neurology*, 2nd ed. Wiley Blackwell, Iowa.

- Mendes L.C.N., Borges A.S., Peiró J.R., Feitosa F.L.F., & Anhesini C.R. 2007. Estudo retrospectivo de 19 casos de polioencefalomalacia, em bovinos, responsivos ao tratamento com tiamina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:239-241.
- Miller, A.D. & Zachary J.F. 2017. Nervous system: Degenerative diseases, p. 805-907. In: Zachary J.F. (Ed.) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th ed., Elsevier, St Louis.
- Morgan K.T. 1974. Amprolium poisoning of preruminant lambs. An ultrastructural study of the cerebral malacia and the nature of the inflammatory response. *J. Pathol.* 112:229-236.
- Morgan K.T., Coop R.L. & Doxey D.L. 1975. Amprolium poisoning of preruminant lambs: an investigation of the encephalopathy and the haemorrhagic and diarrhoeic syndromes. *J. Pathol.* 116:73-81.
- Sant'Ana F.J.F. & Barros C.S.L. 2010. Polioencephalomalacia in ruminants in Brazil. *Braz. J. Vet Pathol.* 3:70-79.
- Sant'Ana F.J.F., Nogueira A.P. A., Souza, R. I. C., Cardinal S.G.; Lemos R.A. A., Barros C.S.L. 2009. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 29:747-752.
- Spicer E.M. & Horton B.J. 1981. Biochemistry of natural and amprolium-induced polioencephalomalacia in sheep. *Aust. Vet. J.* 57:230-235.
- Vandeveld M., Higgins R.J. & Oevermann A. 2012. Polioencephalomacia (PE) or cerebrocortical necrosis (CCN), p. 108-112, In: *Ibid* (Eds.) *Veterinary Neuropathology*, Wiley-Blackwell, Iowa.

Legends of figures

Fig.1. Sheep 3. Affected by amprolium-induced polioencephalomalacia showing opisthotonus.

Fig.2. Sheep 4. Affected by amprolium-induced polioencephalomalacia. Died on day 5 of the experiment. There is edema of the cerebral cortex evidenced by flattening of gyri and narrowing of sulci.

Fig.3. Sheep 6. Recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Brain. Cut surface at the level of basal nuclei. Six-month-old lesion. Loss of cortical tissue can be seen as cavitations (arrows) in the cortical gray matter. CN= caudate nucleus; IC = internal capsule.

Fig.4. Sheep 3. Affected by amprolium-induced polioencephalomalacia. Died after an acute clinical course of two days. There is severe widespread neuronal necrosis, infiltration by foamy macrophages (gitter cells) and cleavage (arrows) of

cerebrocortical lamina resulting in laminar separation. There is also striking prominence of the capillaries due to endothelial cell hyperplasia and hypertrophy. HE, obj.10x.

Fig.5. Sheep 5. Recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Brain. Histopathology of the telencephalic cortex. Six-month-old lesion. The cortex has disappeared leaving a quasi-empty space between the pia-arachnoid (pa) and the subcortical white matter (wm). Within this quasi-empty one can see only remaining vessels and gitter cells. HE, obj.10x.

Fig.6. Sheep 8. Recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Brain. Histopathology of the telencephalic cortex. Six-month-old lesion. Remaining vessels and gitter cells after the dead cortical tissue have been removed. HE, obj.20x. In the inset, one can see the details of the lesion showing vessels (arrows) and gitter cells (arrowheads). HE, obj.40x.

Table1. The evolution of brain lesions in seep recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Experimental design and results

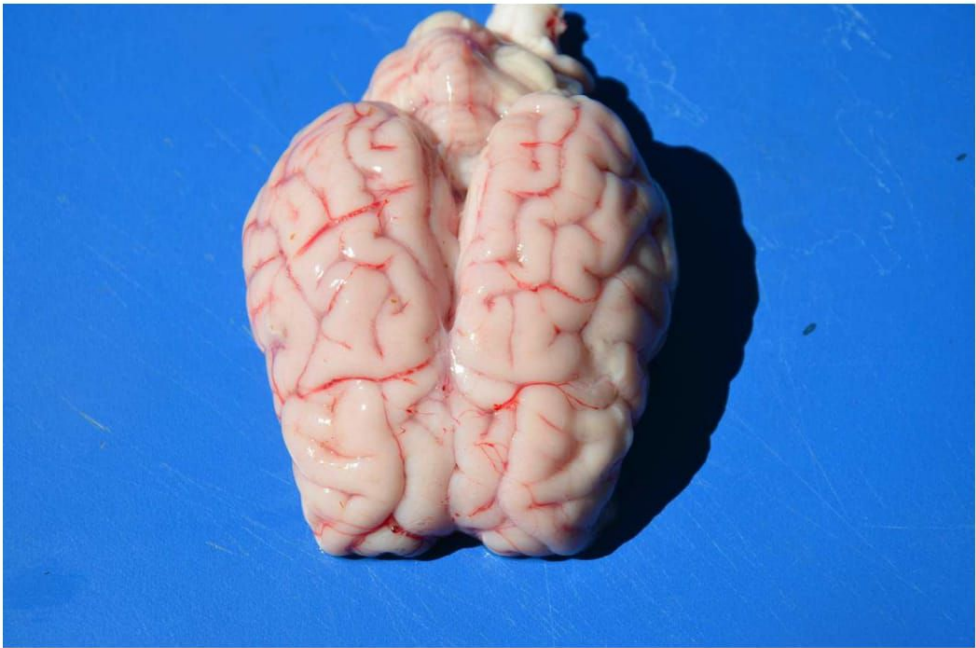
Sheep ID	DD	Clinical signs	Thiamine treatment	Outcome	Histology of brain
Ovino 1 ^a	5	Apathy anorexia and diarrhea starting at day 4 of the experiment.	None	Found dead day 5 of the experiment	Acute lesions
Ovino 2 ^a	10	Apathy anorexia and diarrhea starting at 5 of the experiment.	None	Found dead at day 10 of the experiment	Acute lesions
Ovino 3 ^b	49	Neurological signs starting day 47 of the experiment	None	Died 2 days after the onset of clinical signs	Acute lesions
Ovino 4 ^b	20	Neurological signs at starting day 13 of the experiment	40 mg/kg/bw IM (one dose)	Improved clinical signs within 10 hours and remained normal for 6 months until it was euthanatized	Healed lesions
Ovino 5 ^b	22	Neurological signs starting at day 11 of the experiment	40 mg/kg/bw IM (one dose)	Improved clinical signs within 6 hours and remained normal for 6 months until it was euthanatized	Healed lesions
Ovino 6 ^b	28	Neurological signs starting at day 16 of the experiment	40 mg/kg/bw IM (one dose)	Improved clinical signs within 10 hours and remained normal for 6 months until it was euthanatized	Healed lesions
Ovino 7 ^b	30	Neurological signs starting at day 20 of the experiment	None	Spontaneous recovery after two weeks. Euthanatized six 6 months after recovery	Healed lesions
Ovino 8 ^b	31	Neurological signs starting at day 16 of the experiment	40 mg/kg/bw IM (three doses)	Remained blind for two weeks and then recovery completely. Euthanatized six 6 months after recover	Healed lesions

ID: Identification; DD: number of daily doses; IM: intramuscular. ^aSheep that received amprolium at daily doses of 1,000mg/kg/body weight (bw). ^bSheep that received amprolium at daily doses of 500mg/kg/bw



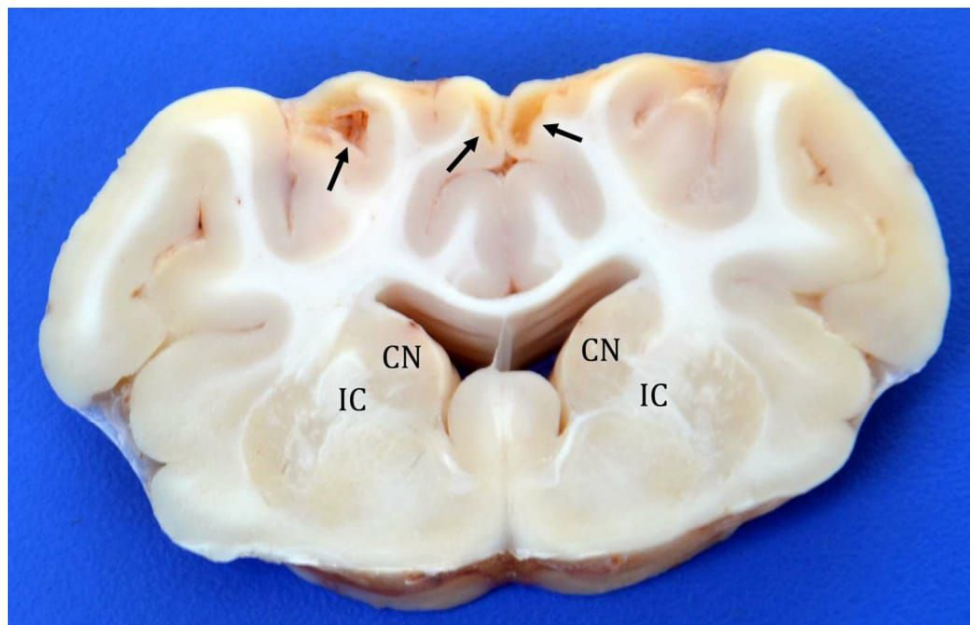
Sheep 3. Affected by amprolium-induced polioencephalomalacia showing opisthotonus.

338x190mm (150 x 150 DPI)



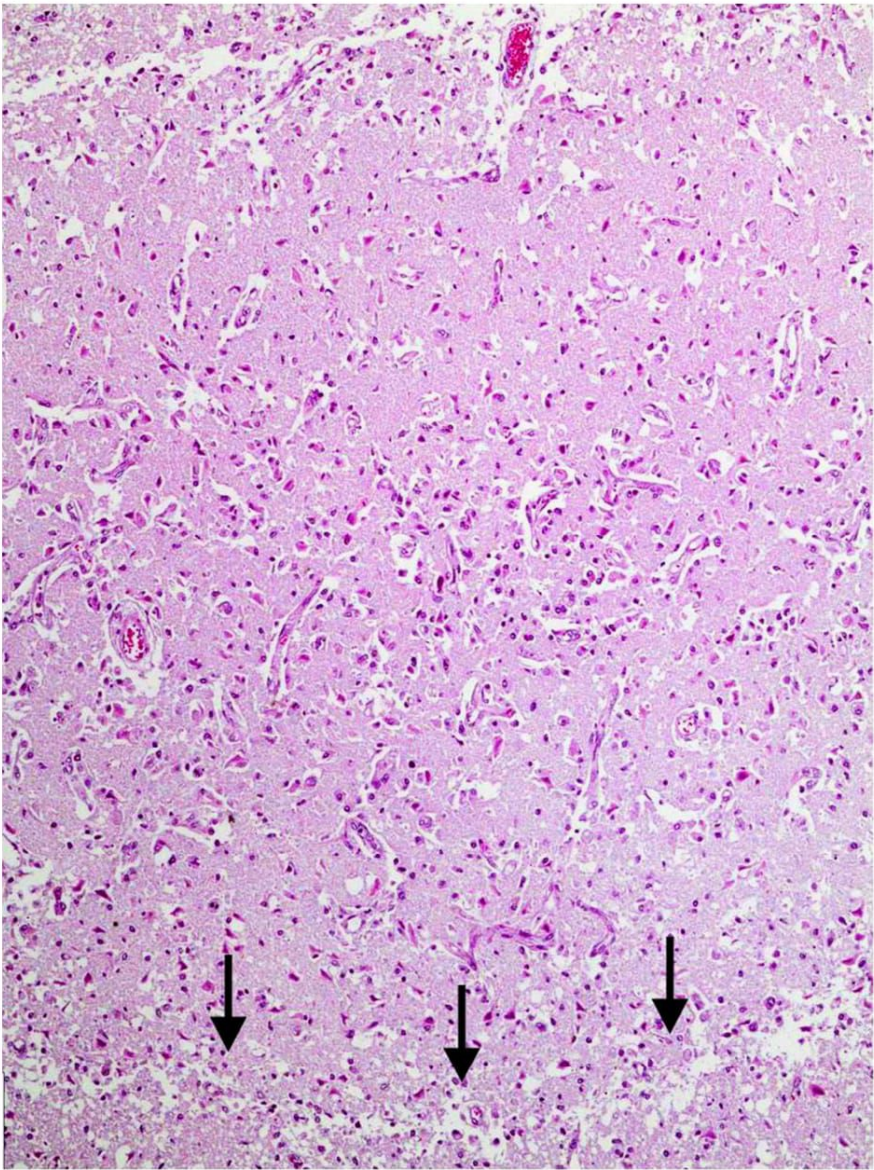
Sheep 4. Affected by amprolium-induced polioencephalomalacia. Died on day 5 of the experiment. There is edema of the cerebral cortex evidenced by flattening of gyri and narrowing of sulci.

287x190mm (150 x 150 DPI)



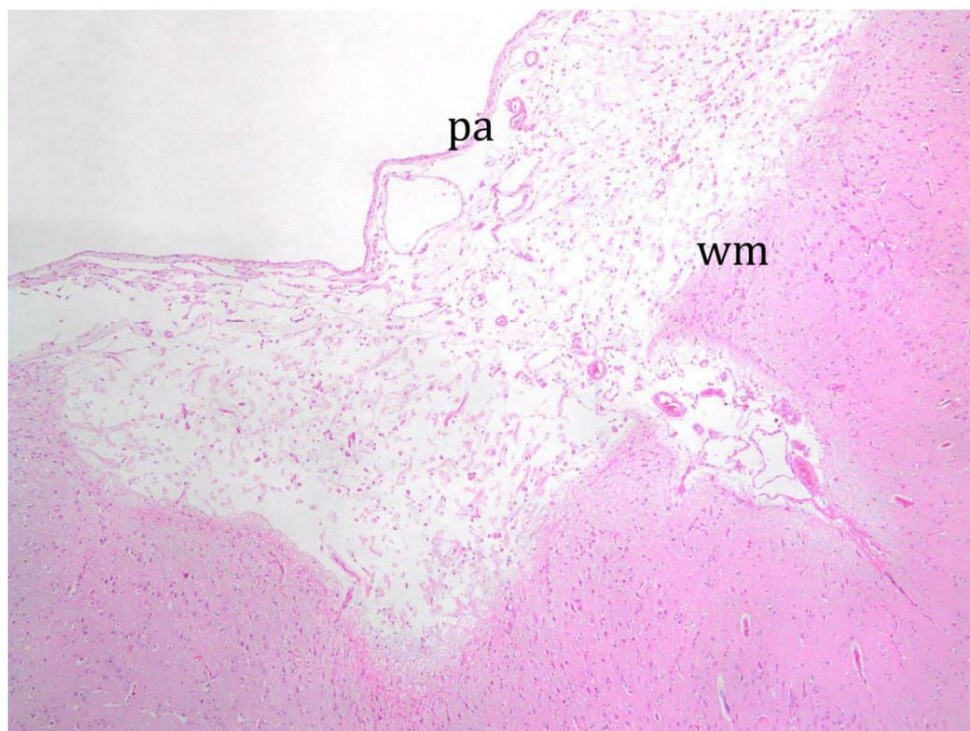
Sheep 6. Recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Brain. Cut surface at the level of basal nuclei. Six-month-old lesion. Loss of cortical tissue can be seen as cavitations (arrows) in the cortical gray matter. CN= caudate nucleus; IC = internal capsule.

296x189mm (150 x 150 DPI)



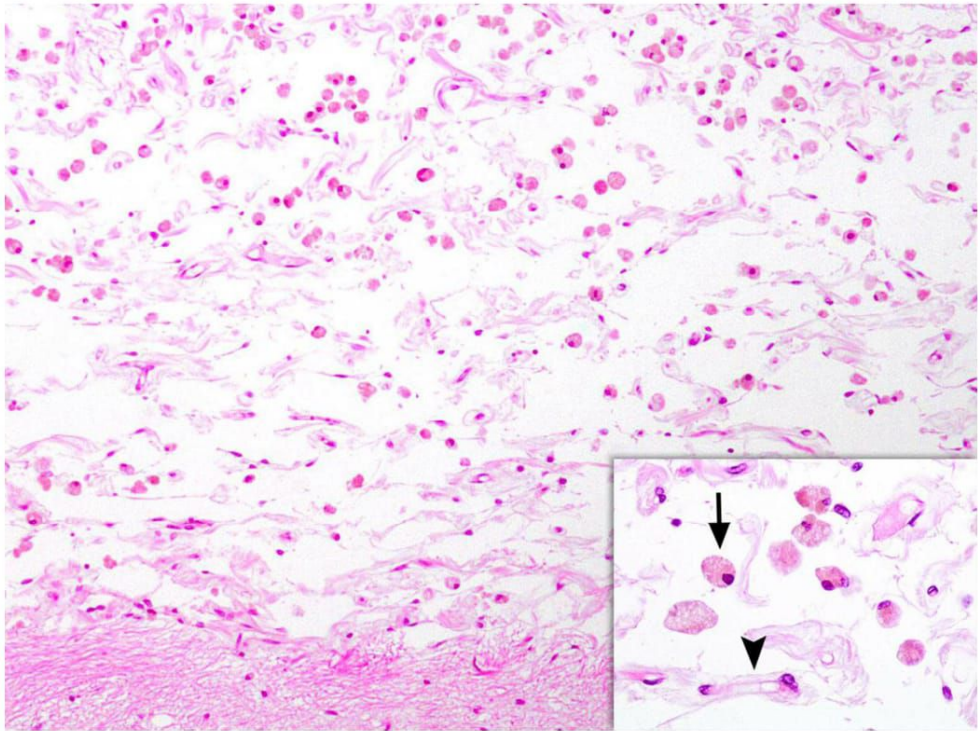
Sheep 3. Affected by amprolium-induced polioencephalomalacia. Died after an acute clinical course of two days. There is severe widespread neuronal necrosis, infiltration by foamy macrophages (gitter cells) and cleavage (arrows) of cerebrocortical lamina resulting in laminar separation. There is also striking prominence of the capillaries due to endothelial cell hyperplasia and hypertrophy. HE, obj.10x.

157x210mm (150 x 150 DPI)



Sheep 5. Recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Brain. Histopathology of the telencephalic cortex. Six-month-old lesion. The cortex has disappeared leaving a quasi-empty space between the pia-arachnoid (pa) and the subcortical white matter (wm). Within this quasi-empty one can see only remaining vessels and gitter cells. HE, obj.10x.

540x404mm (72 x 72 DPI)



Sheep 8. Recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia. Brain. Histopathology of the telencephalic cortex. Six-month-old lesion. Remaining vessels and gitter cells after the dead cortical tissue have been removed. HE, obj.20x. In the inset, one can see the details of the lesion showing vessels (arrows) and gitter cells (arrowheads). HE, obj.40x.

440x329mm (72 x 72 DPI)



Juliana Paniago <juu.paniago@gmail.com>

Fwd: Pesquisa Veterinária Brasileira - Decision on Manuscript ID PVB-5455.R11 mensagem

Danilo Carloto Gomes <danilo.gomes@ufms.br>
Para: Juliana Paniago <juu.paniago@gmail.com>

23 de maio de 2017 14:46

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Pesquisa Veterinária Brasileira" <onbehalfof+claudioslbarros+uol.com.br@manuscriptcentral.com>Para: "Danilo Gomes" <danilo.gomes@ufms.br>

Enviadas: Terça-feira, 23 de maio de 2017 14:19:53

Assunto: Pesquisa Veterinária Brasileira - Decision on Manuscript ID PVB-5455.R1

23-May-2017

Dear Prof. Gomes:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Healing of brain lesions in sheep recovered from amprolium-induced polioencephalomalacia" in its current form for publication in the Pesquisa Veterinária Brasileira.

Your manuscript has been accepted for publication and will be downloaded from the ScholarOne System for production (review and editing). Any information during this process can be obtained through the e-mail: neotecnica@neotecnicaeditora.com.br, with Luiz Carlos (Neotecnica Editora).

Request payment of the publication fee now in:

if you are paying from inside Brazil:

http://grillotecnologia.com.br/pvb-form/index.php?submission_id=PVB-5455.R1

or

if you are paying from outside Brazil:

http://grillotecnologia.com.br/pvb-form/index.php?tp=1&submission_id=PVB-5455.R1

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Pesquisa Veterinária Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Claudio Barros
Editor-in-Chief, Pesquisa Veterinária Brasileira
claudioslbarros@uol.com.br



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezessete, às oito horas, na Sala F da pós-graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Danilo Carloto Gomes (UFMS), Ricardo Antonio Amaral de Lemos (UFMS) e Marcelo Augusto de Araujo (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **JULIANA PANIAGO LORDELLO DE PAULA**, CPF 73351318120, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES CEREBRAIS EM OVINOS RECUPERADOS DE POLIOENCEFALOMALACIA INDUZIDA POR AMPRÓLIO**" e orientação de Danilo Carloto Gomes. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Danilo Carloto Gomes
Dr. Ricardo Antonio Amaral de Lemos
Dr. Marcelo Augusto de Araujo
Dra. Tessie Beck Martins (Suplente)

ASSINATURA

Danilo Carloto Gomes
Ricardo Antonio Amaral de Lemos
Marcelo Augusto de Araujo

AValiação

Aprovada
Aprovada
Aprovada

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Danilo Carloto Gomes
Presidente da Banca Examinadora

Juliana Paniago
Aluna