

Alterações ultra-estruturais do miocárdio na intoxicação experimental de coelhos pela planta calcinogênica *Solanum malacoxylon**

Ultrastructural changes in the myocardium in the experimental poisoning of rabbits by calcinogenic plant *Solanum malacoxylon*

Eliana Dias da Costa MARÇOLLA¹; Claudio S. Lombardo de BARROS¹; Severo Sales de BARROS¹; Denise RUSSOWSKY²

CORRESPONDENCE TO:
Severo Sales de Barros
Laboratório de Microscopia
Eletrônica
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Santa Maria
97119-900 - Santa Maria - RS - Brasil
e-mail: severo@mfs.ccne.ufsm.br

1 - Departamento de Patologia
Universidade Federal Santa
Maria - RS
2 - Bióloga - Bolsista do CNPq

RESUMO

Seis coelhos com cerca de três meses, de ambos os sexos, receberam via sonda gástrica, extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* equivalente a 100 mg de folhas dessecadas por kg de peso vivo. Dois animais não receberam o extrato e serviram como testemunhas, sendo sacrificados ao final do experimento. Entre 48, 72 e 120 horas após o início do experimento, todos os outros coelhos foram sacrificados e fragmentos do miocárdio foram processados para microscopia óptica e eletrônica. As alterações macroscópicas mais importantes foram estrias esbranquiçadas no miocárdio, particularmente no átrio esquerdo. Em microscopia óptica, grupos de células musculares mostravam sarcoplasma tumefeito, com perda das estriações, discreta basofilia e eventualmente vacuolizações do sarcoplasma. Estas células geralmente estavam rodeadas por macrófagos, células mesenquimais e alguns polimorfonucleares neutrófilos de permeio com material necrótico. No interstício foi evidenciado material basofílico finamente granular. A reação de von Kossa nestes locais revelou depósitos de cálcio no sarcoplasma dos miócitos, no interstício e, eventualmente, ao redor de células musculares aparentemente não lesadas. Os vasos coronários exibiam mineralização da média. Na ultra-estrutura foram observadas: ativação dos cardiomiócitos e das células intersticiais, deposição do cálcio no interstício e no sarcoplasma das células musculares cardíacas e no citoplasma de células intersticiais. Em fases mais avançadas observou-se necrose dos cardiomiócitos, com mineralização das células e lise celular. Alguns polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos fagocitando material necrótico mineralizado são também vistos nestes locais. O aspecto morfológico do miocárdio surge que as lesões de necrose e calcificação são o resultado da ação direta do 1,25(OH)₂D₃ contido na planta sobre as células do miocárdio. Os animais testemunhas não exibiram alterações no miocárdio.

UNITERMOS: Calcificação; Miocárdio, Plantas venenosas; Coelhos; Intoxicação por plantas.

INTRODUÇÃO

Plantas calcinogênicas têm sido associadas a surtos graves de calcinose em animais domésticos em diversos países^{8,9,12,13,18,28,31}. As calcinoses são enfermidades de caráter crônico debilitante, que se caracterizam pela mineralização dos tecidos moles, principalmente do sistema cardiovascular. A morbidade e mortalidade são bastante variáveis, mas as perdas econômicas são consideráveis^{7,29}.

No Brasil, pelo menos duas plantas demonstraram-se causadoras de calcinose espontânea em bovinos e ovinos: *Solanum malacoxylon* e *Nierembergia veitchii*^{13,28}.

A ação tóxica de *S. malacoxylon*¹⁰ e *N. veitchii*²⁸, assim como de outras plantas calcinogênicas²⁷, deve-se à presença do 1,25-dihidroxicolecalciferol, metabólito ativo da vitamina D₃. Como essa substância ocorre pré-formada, em grandes quantidades, nos tecidos dessas plantas calcinogênicas, o sistema retroalimentar que controla fisiologicamente a síntese do 1,25(OH)₂D₃ no rim é ultrapassado. Dessa forma, os níveis do 1,25(OH)₂D₃ no soro elevam-se e desen-

cadeiam o processo de calcificação por sensibilização de diferentes células-alvo e por aumento da absorção do cálcio no intestino.

Os sinais clínicos e as lesões macro e microscópicas produzidas por essas plantas estão fartamente documentados^{4,8,9,11,13,14,17,21,25,28}. Estudos ultra-estruturais já foram feitos nas artérias⁵ e no estômago²⁴ de coelhos experimentalmente intoxicados com *S. malacoxylon*. No entanto, pouco se conhece sobre as alterações ultra-estruturais no miocárdio em que as observações em microscopia óptica têm colocado em evidência alterações importantes nas calcinose espontâneas^{4,11,21,30} e nas intoxicações experimentais por *S. malacoxylon*^{7,14}. Neste trabalho são estudadas as alterações ultra-estruturais do miocárdio em coelhos experimentalmente intoxicados com *S. malacoxylon*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Foram utilizados 8 coelhos da raça Nova Zelândia com três meses de idade, de ambos os sexos. Os animais foram alojados em gaiolas metálicas individuais e receberam ração comercial granulada para coelhos** e água *ad libitum*.

Seis coelhos receberam diariamente, via sonda gástrica,

* Trabalho parcialmente financiado pelo Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

** Ração Sarai para coelhos, SIGMA Industrial, Rua General Marcondes Salgado, 298, 2º andar, 04094-020, São Paulo, SP

extrato de *S. malacoxylon* correspondente a 100 mg de folhas secas por kg de peso corporal. Dois coelhos não receberam o extrato e serviram como testemunhas. Quatro animais foram sacrificados *in extremis* por exanguinação, prévia narcose por éter, entre 48 e 72 horas após o início do experimento, e dois animais foram sacrificados da mesma forma após cinco dias, juntamente com os testemunhas.

Todos os animais foram necropsiados logo após o sacrifício e os corações foram fixados em formol a 10% tamponado. Fragmentos dos átrios e dos ventrículos foram incluídos em parafina e os cortes de 5 µm de espessura, cortados pela hematoxilina e eosina e pelo método de von Kossa. De dois animais sacrificados entre 48 e 72 horas, de um sacrificado aos 5 dias e de um testemunha foram coletados, imediatamente após o sacrifício, pequenos fragmentos do miocárdio, fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio a 4°C por duas horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato de sódio por duas horas, desidratados em soluções crescentes de etanol e incluídos em Epon.

Os cortes semifinos foram corados pelo azul de metileno e os cortes ultrafinos foram recolhidos em telas de cobre e contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

Extrato da planta

O extrato foi preparado colocando-se 5 g de folhas de *S. malacoxylon*, dessecadas à sombra e pulverizadas, em 100 ml de água destilada, por 24 horas em refrigerador. Após, o extrato foi tamizado em gaze e estocado em refrigerador até o momento do uso. Desta forma, cada ml do extrato correspondia a 50 mg da planta seca.

RESULTADOS

Alterações macroscópicas

As alterações macroscópicas no miocárdio dos seis animais variaram consideravelmente em intensidade e distribuição. O músculo cardíaco mostrou manchas e estrias esbranquiçadas distribuídas tanto nos átrios como nos ventrículos. Alterações similares foram também detectadas nos septos interventriculares. Os vasos coronários subepicárdicos apareciam com nitidez e de coloração esbranquiçada. Não foram observadas alterações macroscópicas no endocárdio e no pericárdio.

Microscopia óptica

Na microscopia óptica, grupos de células musculares apareciam tumefeitas, com sarcoplasma homogêneo, perda das estriações e discreta basofilia. Outros miócitos exibiam vacuolização e lise do sarcoplasma. Essas células estavam geralmente rodeadas por macrófagos, fibroblastos e por raros polimorfonucleares neutrófilos. Nesses locais, freqüentemente, eram encontrados restos de material necrótico. No interstício foi identificado material basofílico pulverulento ou grosseiramente granular. A reação de von Kossa revelou, nesse locais, depósitos de cálcio no sarcoplasma dos miócitos, no interstício e, ocasionalmente, ao redor de células musculares aparentemente não lesadas. Essas lesões ocorriam com distribuição focal, geralmente de localização subepicárdica e subendocárdica e, freqüentemente, próximas a vasos sanguíneos. Os ramos da artéria coronária exibiam áreas

de mineralização da média, distribuídas de forma irregular. Nos animais sacrificados aos 5 dias foi observado um aumento da fibrose nos focos de necrose e mineralização.

Microscopia eletrônica

A alteração ultra-estrutural mais precoce observada foi a distensão das miofibrilas, acompanhada de aumento do espaço interfibrilar, dilatação do retículo sarcoplásmico e cisterna perinuclear. Eventualmente, foram encontradas figuras de mielina nesses espaços dilatados e massas esféricas eletrodensas, algumas exibindo uma estriação concêntrica constituída por faixas eletrodensas e eletrolúcidas (Fig. 1). Ribossomos livres e gotas lipídicas foram também vistos com freqüência. As mitocôndrias estavam inalteradas ou tumefeitas, com desorganização das cristas, matriz flocular e vacuolizações contendo figuras mielínicas. As alterações degenerativas dos miócitos eram acompanhadas por acentuada diminuição dos grânulos de glicogênio. Em células necróticas, as mitocôndrias mostravam depósitos de material eletrodense sob a forma de massas circulares com centro eletrolúcido (Fig. 2). Em estágios mais avançados, os elementos contráteis sofreram desintegração e transformaram-se em massa amorfa eletrodensa, sobre a qual foram observados depósitos minerais de forma cristalina ou amorfa. Algumas dessas células necróticas estavam em íntimo contato com células que apresentavam estruturas bem conservadas (Fig. 2). Mineralização de mitocôndrias só foi observada em células necróticas. Em fases mais avançadas, o sarcolema rompia-se e o material necrótico era liberado no interstício (Fig. 3).

No espaço extracelular foram vistas, além de restos de material necrótico sobre os quais se depositava cálcio, numerosas formações mineralizadas, geralmente de forma circular, constituídas por faixas eletrodensas e eletrolúcidas. Freqüentemente, estas formações sofrem coalescência tanto no interstício quanto no interior dos miócitos. Macrófagos, fagocitando material necrótico e estruturas mineralizadas, foram vistos com freqüência (Fig. 3). Estas células foram também vistas em miócitos não necróticos.

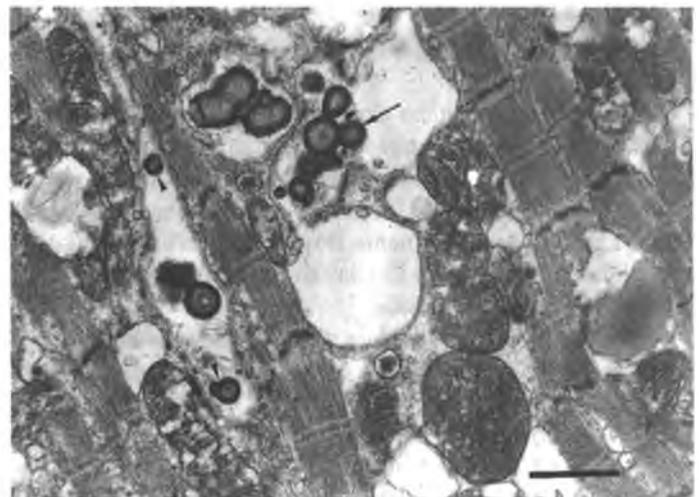


Figura 1

Corte longitudinal de cardiomiócito exibindo acentuada dilatação do retículo sarcoplásmico. Algumas cisternas mostram depósitos de cálcio sob a forma de estruturas concêntricas de faixas eletrodensas e eletrolúcidas (seta). Estruturas semelhantes são vistas no interstício (ponta de seta). Notar desaparecimento dos grânulos de glicogênio. Algumas mitocôndrias mostram matriz flocular, desorganização e destruição das cristas. Barra 1µm.

Nas proximidades dos miócitos alterados foram encontradas células mesenquimais, que se caracterizavam por núcleos alongados com nucléolo bem evidente, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, geralmente dilatado, numerosos polirribossomos, algumas gotas lipídicas e, ocasionalmente, depósitos de cálcio geralmente em meio a abundante colágeno (Fig. 4). Polimorfonucleares neutrófilos foram eventualmente encontrados nesses locais. Os animais testemunhas não mostraram lesões no miocárdio.

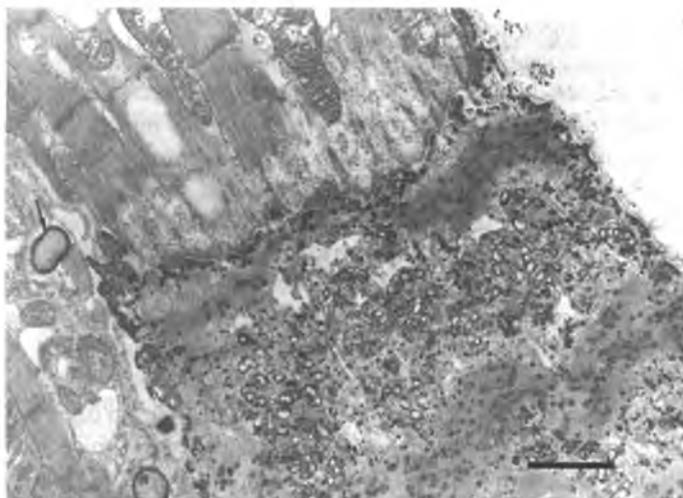


Figura 2

Cardiomiócito necrótico mostrando homogeneização das miofibrilas. Depósitos minerais sob a forma de pequenos cristais distribuídos difusamente são vistos pelo sarcoplasma. Notar deposições de cálcio nas mitocôndrias, sob a forma circular ou ovóide com centro eletrolúcido. Na porção superior esquerda, vê-se célula aparentemente não lesada separada da célula necrótica por disco intercalar. No canto inferior esquerdo, observa-se cardiomiócito exibindo dilatação do retículo sarcoplásmico e presença de minerais no seu interior (seta). Barra 1 μm .

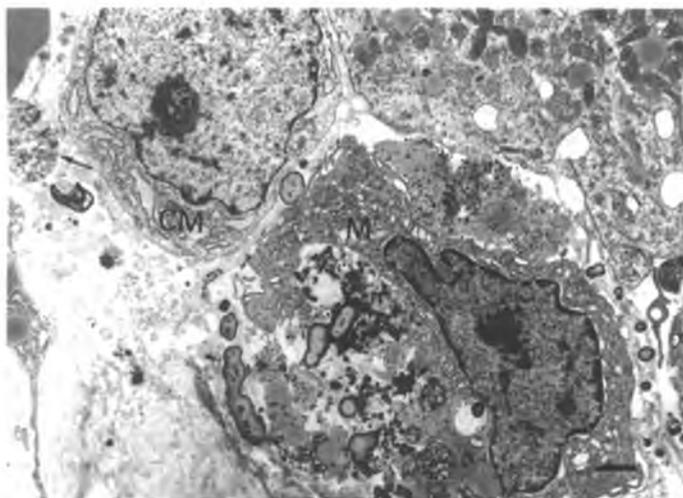


Figura 3

Cardiomiócito no canto superior direito mostrando desorganização dos feixes de miofibrilas, deposição de cálcio sob forma finamente granular e dilatação do retículo sarcoplásmico. Notar macrófago (M) fagocitando material necrótico parcialmente mineralizado e célula mesenquimal (CM) com abundante retículo endoplasmático rugoso e numerosos polirribossomos. Fragmento celular com depósito de cálcio sob a forma de agulhas (seta) e estruturas mineralizadas de forma concêntrica, algumas em coalescência (ponta de seta), são vistos no interstício. Barra 2 μm .

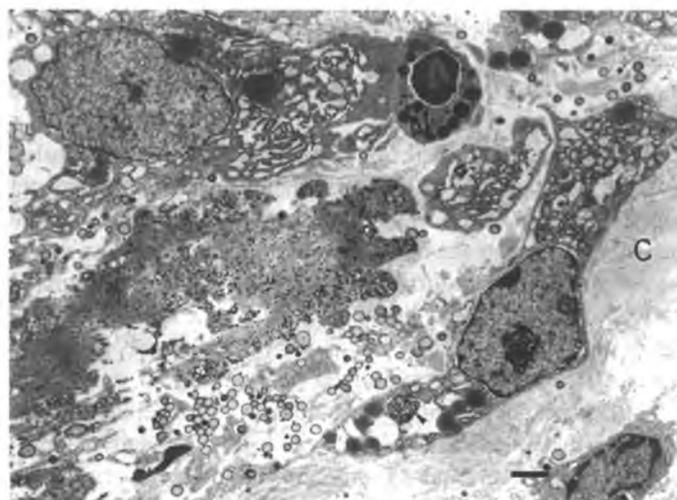


Figura 4

Células mesenquimais ativadas, exibindo abundante retículo endoplasmático rugoso dilatado, algumas gotas lipídicas, numerosos polirribossomos e estruturas mineralizadas sob a forma acicular no citoplasma (ponta de seta). No interstício observam-se mineralizações sob a forma concêntrica, restos de material necrótico parcialmente mineralizados, abundantes fibras colágenas (C) e polimorfonuclear neutrófilo (N). Barra 4 μm .

DISCUSSÃO

O miocárdio dos coelhos desse experimento mostrou necrose multifocal distribuída nas aurículas e nos ventrículos. Esses focos necróticos consistiam em coagulação ou lise nos miócitos, geralmente acompanhados de infiltrado de células mononucleares e alguns poucos polimorfonucleares neutrófilos. Esses focos de necrose geralmente ocorriam próximos a vasos sanguíneos, mas, em algumas oportunidades, também foram encontrados distantes dos mesmos. Essas alterações são basicamente as mesmas descritas na hipervitaminose D experimental entre ratos³².

As mineralizações do miocárdio observadas nesse experimento foram sempre de menor intensidade que as descritas nas calcinose espontâneas^{1,4,11,17,19,21,30}, provavelmente porque nas enfermidades espontâneas a ação das plantas calcinogênicas ocorre num tempo bem maior do que nos casos experimentais do presente estudo.

Necrose de coagulação e cardiomiocitólise são características de diferentes estágios do infarto³. Neste trabalho, não foi possível associar as lesões encontradas a infarto, pois não foram encontradas lesões vasculares que justificassem essa etiologia. A coexistência próxima de células necróticas e células viáveis, às vezes separadas somente pelo disco intercalar (Fig. 2), também corrobora a idéia de que os focos necróticos não resultam de isquemia do miocárdio.

Na deficiência de magnésio experimental em ratos¹⁵ foi verificado que a calcificação e necrose do miocárdio se inicia com tumefação das mitocôndrias, desorganização das cristas e deposição de material eletrodense, provavelmente cálcio, na matriz, eventualmente ocupando toda a mitocôndria. Neste trabalho e na intoxicação por vitamina D³² não foram encontradas deposições de cálcio nas mitocôndrias de células viáveis.

Os macrófagos ocorriam em grande número próximos às áreas de necrose e, em muitos deles, pôde ser observada intensa

atividade fagocitária de restos celulares necróticos parcialmente mineralizados. Foram as células predominantes nesses locais e apareceram muito precocemente, ocorrendo mesmo entre cardiomiócitos não necróticos.

Foi notável o incremento no número de células mesenquimais do interstício, observado tanto na microscopia óptica como na eletrônica. Particularmente nessas células houve uma ativação acentuada do retículo endoplasmático e um incremento no número de polirribossomos, indicando um aumento da atividade sintética, que se traduz por aumento de fibras colágenas nessas áreas. Essa ativação das células mesenquimais provavelmente está associada à ação direta do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ contido na planta, como já foi sugerido para as alterações das células musculares lisas da parede da aorta⁵ e da parede do estômago²⁴ na intoxicação experimental por *S. malacoxylon*. Receptores para o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ têm sido detectados em numerosos tecidos, até mesmo miocárdio e fibroblastos²⁶. A ação de diferenciação e proliferação celulares do $1,25$ -dihidroxicolecalciferol, em diferentes tecidos, tem sido relatada em numerosos trabalhos^{16,22,23,26}. Essas constatações reforçam a hipótese de que as alterações observadas neste trabalho nos cardiomiócitos e nas células intersticiais, e provavelmente também na intoxicação pela vitamina D, são manifestações de uma ação direta do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre essas células.

O mecanismo da deposição de cálcio, tanto no interstício

como no sarcoplasma dos cardiomiócitos e das células mesenquimais ativadas, é ainda objeto de discussão. O $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode promover o aumento do cálcio nas células musculares cardíacas por uma ativação dos canais do cálcio nas membranas⁶. Tem sido sugerido, por outro lado, que o aumento do cálcio intracelular nas células do miocárdio, em consequência da hipercalcemia, seria a causa da necrose destas células³², em oposição à teoria que considera que os depósitos intracelulares de cálcio, no curso de hipervitaminose D, ocorreriam em células estruturalmente já lesadas².

Verificou-se que na hipervitaminose D induzida em ratos, as alterações do miocárdio aparecem não somente como necrose e calcificação, mas também como ativação dos miócitos e das células intersticiais, e que esta estimulação da estrutura das células musculares persistia algum tempo depois da administração da vitamina D³². Isso sugere que deve haver um outro mecanismo envolvido na gênese destes processos, além do aumento da calcemia exercido pela vitamina D. Alterações celulares semelhantes já foram descritas nas células musculares lisas da parede e mucosa do estômago nas intoxicações experimentais por *S. malacoxylon* em coelhos²⁴, o que parece indicar que a diferenciação celular induzida pelo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desempenha um papel importante na patogenia do processo de mineralização do miocárdio observado neste trabalho.

SUMMARY

Six rabbits of both sexes, 3-months old, were given via gastric tube an aqueous extract of the plant *Solanum malacoxylon*, equivalent to 100 mg of dried leaves per kg of body weight. Two rabbits (controls) did not receive the extract and were killed at the end of the experiment. All others rabbits were killed at 48, 72 and 120 hours after extract administration. Fragments of myocardium were sampled and processed for both light and electron microscopy. Most significant gross changes observed were whitish streaks in the myocardium, especially in the right atrium. On light microscopic examination, groups of muscle cells had swollen sarcoplasmas with loss of striations, slight basophilia and eventual sarcoplasmic vacuolizations. These groups of cells were usually surrounded by macrophages, mesenchymal cells and few neutrophils admixed with necrotic debris. There was a delicate granular basophilic material in the interstitium. Von Kossa staining revealed, at these sites, calcium deposits within the sarcoplasm of cardiac myocytes in the interstitium and, occasionally, around apparently non damaged myocytes. There was mineralization of the medial tunic of coronary arteries. On the EM examination the following changes were observed: activation of cardiac myocytes and interstitial cells, calcium deposits in the interstitium and in the sarcoplasm of cardiac myocytes, as well as in the cytoplasm of interstitial cells. In late stages there was necrosis of cardiac myocytes, with mineralization and cytolysis. Few neutrophils and macrophages, with phagocytized mineral necrotic debris were also observed at these sites. The morphological aspect of the myocardium suggests that necrosis and calcification result from the direct action of the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ present in the plant on the myocardial cells. No changes in the myocardium of control rabbits were found.

UNITERMS: Calcification; Myocardium; Poisonous plants; Rabbits; Plant poisoning.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ARNOLD, R.M.; BRASS G. Observations on the morbid anatomy and histology of Manchester Wasting Disease and related conditions in other countries of America. *American Journal of Veterinary Research*. v.17, n.65, p.630-9, 1956.
- 2-BAJUSZ, E.; JASMIN, G. Studies on factors that selectively influence calcification in the myocardium. *Cardiologia*, v.43, n.1, p.104-14, 1963.
- 3-BAROLDI, G. Different morphological types of myocardial cell death in man. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, v.6, p.383-97, 1975.
- 4-BARROS, S.S.; POHLENZ, J.; SANTIAGO, C. Zur kalzinose beim schaf. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v.77, n.14, p.346-9, 1970.
- 5-BARROS, S.; TABONE, E.; SANTOS, M.; ANDUJAR, M.; GRIMAUD, J.A. Histological and ultrastructural alterations in the aorta in experimental *Solanum malacoxylon* poisoning. *Virchows Archiv B (Cell Pathol.)*, v.35, n.2, p.167-75, 1981.

- 6-BOLAND, R.L. *S. malacoxylon*: a toxic plant which affects animal calcium metabolism. *Biomedical and Environmental Sciences*, v.1, p.414-23, 1988.
- 7-CAMBEROS, H.R.; DAVIS, G.K.; DJAFAR, M.I.; SIMPSON, C.F. Soft tissues calcification in guinea pigs fed the poisonous plant *Solanum malacoxylon*. *American Journal of Veterinary Research*. v.31, n.4, p.585-96, 1970.
- 8-CARRILLO, B.; WORKER, N.A. "Enteque seco": arteriosclerosis y calcificación metastática de origen tóxico en animales de pastoreo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA*, v.4, n.2, p.9-30, 1967.
- 9-COLLIER, W.A. Zur Kenntnis als Enteque bezeichneten Krankheit der Rind in der Provinz Buenos Aires. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten parasitär Krankheiten und Hygiene der Haustiere*, v.31, p.81-92, 1927.
- 10-CORRADINO, R.A.; WASSERMAN, R.M. $1,25$ -dihydroxycholecalciferol-like activity of *Solanum malacoxylon* extract on calcium transport. *Nature*, v.252, p.716-8, 1974.
- 11-DIRKSEN, G.; PLANK, P.; HÄNICHEN, T.; SPIESS, A. Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. *Deutsche tierärztliche wochenschrift*. v.79, n.4, p.77-9, 1970.

- 12-DIRKSEN, G.; PLANK, P.; HÄNICHEN, T.; SPIESS, A. Über eine enzootische Kalzinose beim Rind 5. Experimentelle Untersuchungen am Kaninchen mit selective Verfütterung von Knaulgrass (*Dactylis glomerata*), Golhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Gräsergemischt. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**. v.79, p.77-9, 1972.
- 13-DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; COSTA, J.L.E.; DAYRELL, M.D.S. "Espichamento", intoxicação em bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal do Mato Grosso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, sér. vet., v.6, p.91-117, 1971.
- 14-GIMENO, E. Estudio histopatológico del enteque seco experimental en ratas y revision bibliográfica de las calcinosis. **Analecta Veterinaria**, v.10, n.1, p.55-93, 1978.
- 15-HEGGTVEIT, H.A.; HERMAN, L.; MISHRA, R.K. Cardiac necrosis and calcification in experimental magnesium deficiency. **Animal Journal of Pathology**. v.45, n.5, p.757-2, 1964.
- 16-KOH, E.; MORIMOTO, S.; FUKUO, K.; HIRONAKA, T.; SHIRAIASHI, T.; ONASHI, T.; KUMAMARA, Y. 1,25 - Dihydroxy vitamin D₃ binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. **Life Science**. v.42, n.2, p.215-23, 1987.
- 17-KÖHER, H.; LIBISELLER, R. Über das Auftreten der sogenannten Weidekrankheit bei Kühen in Österreich in Zusammenhang mit Düngung und Fütterung. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. A**. v.17, n.4, p.289-337, 1970.
- 18-KROOK, L.; WASSERMAN, R.H.; SHIVELY, J.N.; TASHIJAN, A.H.; BROKKEN, T.D.; MORTON, J.F. Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: implication of the shrub *Cestrum diurnum* as the causative agent. **The Cornell Veterinarian**. v.65, n.1, p.26-56, 1975.
- 19-KWATRA, M.S.; HOTH, D.S.; SING, A.; CHAWALA, R.S. Arteriosclerosis with metastatic calcification in Corriedade sheep in Punjab. **Atherosclerosis**, v.19, n.2, p.521-8, 1974.
- 20-LIGNIÈRES, J. Arteriosclerosis epidémica en el ovino. **Resvista Zootécnica**. v.4, n.37, p.1-7, 1912.
- 21-LYND, F.T.; WILLERS, E.H.; WEIGHT, L.A.; GEBAUER, P.W. Bovine arteriosclerosis in Hawaii. **American Journal of Veterinary Research**. v.16, n.115, p.1344-9, 1965.
- 22-MANOLAGAS, S.C.; HUSTMYER, F.G.; YU, X. Immunomodulating properties of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. **Kidney International**, v.38, p. S-9-S-16, 1990. Supplement 29.
- 23-MERKE, J.; HOFMANN, W.; GOLDSCHMIDT, D.; RITZ, E. Demonstration of 1,25(OH)₂D₃ receptors and action in vascular smooth muscle cells in vitro. **Calcified Tissue International**. v.41, p.112-4, 1987.
- 24-MORAÑA, J.A.; BARROS, S.S.; DRIEMEIER, D.; FLORES, I. Gastropatia em coelhos experimentalmente induzida pela planta calcinogênica *Solanum malacoxylon*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.14, p.35-42, 1994.
- 25-NEUMAN, F.; NOBEL, T.; KLOPER, U. Calcinosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**. v.83, p.343-50, 1973.
- 26-POLS, H.A.P.; BIRKENHÄNGER, J.C.; FOEKENS, J.A.; VAN LEEUWEN, J.P.T. Vitamin D: a modulator of cell proliferation and differentiation. **J. Ster. Biochem. Mol. Biol.**, v.37, p.873-6, 1990.
- 27-RAMBECK, W.A.; ZUCKER, H. Vitamin D-artige aktivitäten in calcinogenen Pflanzen. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. A**. v.29, n.415, p.289-96, 1982.
- 28-RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C.; WASSERMAN, R.; KROOK, L. Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.3, p.85-95, 1987.
- 29-TARRÉS, M.C.; LIBORIO, M.M.; JUSTER, G.; OSMENTI, G.; PUCHE, R.C. Evaluación de la incidencia del enteque seco en la provincia de Santa Fé y del perjuicio involucrado. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.58, n.5-6, p.387-97, 1977.
- 30-TUSTIN, R.; PIENNAR, C.; FAND, J.; SCHMITH, J.; VAN DER WALT, K.; BOYAZOGLU, P.; BOOM, H. Enzootic calcinosis in sheep in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.44, n.4, p.383-95, 1973.
- 31-WASSERMAN, R.H. Active Vitamin D-like substances in *Solanum malacoxylon* and other calcinogenic plants. **Nutrition Reviews**, v.33, n.1, p.1-5, 1975.
- 32-WRZOLKOWO, T.; SYDOWO, M. Ultrastructural studies on the vitamin D induced heart lesions in the rat. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.12, p.1117-33, 1980.