



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES
ESTÁGIOS DE CRESCIMENTO DA *Brachiaria*
decumbens EM OVINOS**

HELVÉCIO LEAL SANTOS JÚNIOR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA-DF
DEZEMBRO/ 2008**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES
ESTÁGIOS DE CRESCIMENTO DA *Brachiaria*
decumbens EM OVINOS**

HELVÉCIO LEAL SANTOS JÚNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 005/08

**BRASÍLIA-DF
DEZEMBRO/ 2008**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SANTOS JÚNIOR, H. L. **Estudo da Toxicidade de Diferentes Estágios de Crescimento da *Brachiaria decumbens* em Ovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 65p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos Júnior, Helvécio Leal

Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos. / Helvécio Leal Santos Júnior orientação de Márcio Botelho de Castro – Brasília, 2008. p.70: il.

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Ovino. 2. *Brachiaria decumbens*. 3. Fotossensibilização. 4. Protodioscina.
I.SANTOS JÚNIOR, H.L. II. Título.

CDU 591.13



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE CRESCIMENTO DA *Brachiaria* *decumbens* EM OVINOS

HELVÉCIO LEAL SANTOS JÚNIOR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro (Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Roselene Ecco (Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó (Universidade Federal de Uberlândia)

BRASÍLIA, 11 de dezembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família, minha mãe, meu pai e meus irmãos que muito me incentivaram durante minha vida;

Agradeço a Deus por ter me guiado em todo meu caminho, principalmente nos momentos mais difíceis onde ninguém mais queria estender as mãos;

A minha esposa Thaís e ao meu filho Luís Eduardo pelo amor, paciência e companheirismo;

Agradeço ao meu orientador, professor Márcio, pela amizade e por me aceitar como orientado. Agradeço pela paciência, disponibilidade e dedicação;

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Patologia da Unb, em especial a Mirna e a Vanessa, pois sem a grande ajuda de vocês com certeza eu não conseguiria continuar com os projetos;

Agradeço a professora Rose, pelo conhecimento durante minha formação, amizade e confiança;

Agradeço ao professor Tury pelos ensinamentos e amizade transmitidos durante os anos;

Ao professor Riet-Correa e ao Instituto Millenium pela oportunidade e contribuição com este projeto;

Agradeço a UPIS por acreditar no meu conhecimento e por facilitar a realização deste mestrado;

Agradeço a Dra. Mitsue Haraguchi e ao Dr. Marcos pelas dosagens dos níveis de saponinas nas pastagens;

Agradecimento especial ao suporte financeiro do CNPq.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
CÁPITULO I	1
Introdução	1
Referencial teórico	3
Objetivos	9
Referências	10
CAPÍTULO II	16
Introdução	16
Material e métodos	19
Resultados	22
Discussão	36
Conclusões	46
Referências	47
CAPÍTULO III	55
Considerações finais	55
ANEXOS	57

RESUMO

Foram introduzidos em três piquetes (P, M e G) cultivados com *Brachiaria decumbens*, 21 ovinos, machos, de 4 meses de idade, durante dois meses. Nos piquetes a forrageira tinha 15, 45 e 90 dias de crescimento respectivamente. O aumento na concentração da enzima sérica aspartatoaminotransferase ocorreu na semana após o início do experimento nos grupos P e M e sétima semana no grupo G, enquanto que o aumento da gama-glutamyltransferase ocorreu na segunda semana no grupo P e M e no grupo G ocorreu na quarta semana. Os principais sinais clínicos incluíram apatia, fotofobia, secreção ocular bilateral, hiperemia e icterícia de mucosas além de edema de face. Quando os animais apresentavam os sinais clínicos severos da intoxicação eram retirados do experimento e realizava-se a biópsia hepática guiada por ultrassom. Os ovinos que morreram foram necropsiados. Os achados de necropsia foram a hepatomegalia e distensão da vesícula biliar. Na avaliação microscópica das biópsias e dos animais necropsiados os principais achados incluíam: tumefação e vacuolização de hepatócitos, macrófagos espumosos, colestase e cristais na luz de ductos biliares. A microscopia eletrônica do fígado dos animais intoxicados revelou hiperplasia de retículo endoplasmático liso associado a presença de cristais no citoplasma de hepatócitos. Não foram observados esporos do fungo *Pithomyces chartarum* nas coletas realizadas durante o experimento. Na avaliação dos níveis de protodioscina o grupo P, grupo em que a pastagem apresentava intensa brotação apresentou a maior concentração dos níveis de protodioscina.

Palavras chaves: Ovino, *Brachiaria decumbens*, fotossensibilização, protodioscina.

ABSTRACT

Were introduced into three paddocks (P, M e G) cultivated with *Brachiaria decumbens*, 21 sheep, male, from 4 months of age, for two months. In the pickets had forage 15, 45 and 90 days of growth respectively. Increase in the concentration of seric enzyme aspartatoaminotransferase occurred in the after the start of the experimente in group P and M and at the seventh week in group G, while the increase in gamaglutamiltransferase ocorred in the second week in group P and M and in group G occurred in the fourth week. The main clinical signs included apathy, photophobia, bilateral ocular secretions, mucous hyperemia of jaundice and facial swelling. When the animals showed clinical signs of sever intoxication they were withdraw from the experiment and it was performed an ultrasound guided liver biopsy. The sheep's that died were necropsied. The findings of the necropsy were hepatomegaly and distension of the gallbladder. In the microscopic assessment of biopsies and animals corpses the main findings included: swelling and vacuolization of hepatocytes, macrophages sparkling, crystal and cholestasis in light of bile ducts. The electron microscopy of liver of the poisoned animals reveled hyperplasia of smooth endoplasmic reticulum associated with the presence of crystals in the cytoplasm of hepatocytes. There were no *Pitomyces chartarum* spore in samples taken during the experiment. In assessing the levels of protodioscina the group P, group where the pasture was intense shooting had the highest concentration levels of protodioscina.

Keys words: Sheep, *Brachiaria decumbens*, photosensitization, protodioscina.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismo de formação dos cristais na intoxicação por <i>B. decumbens</i> .	5
FIGURA 2. Ovino do grupo P intoxicado por <i>B. decumbens</i> apresentando lesões decorrentes a fotossensibilização nas áreas claras da pele - Brasília, 2007.	28
FIGURA 3. Ovino do grupo P intoxicado demonstrando severo edema de face e orelha - Brasília, 2007.	28
FIGURA 4. Níveis de AST de ovinos do Grupo P, grupo M e Grupo G, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 15, 45 e 90 dias de crescimento respectivamente - Brasília, 2007.	29
FIGURA 5. Níveis de AST individual dos ovinos do grupo P, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 15 dias de crescimento - Brasília, 2007.	29
FIGURA 6. Níveis de AST individual dos ovinos do grupo M, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 45 dias de crescimento - Brasília, 2007.	30
FIGURA 7. Níveis de AST individual dos ovinos do grupo G, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 90 dias de crescimento - Brasília, 2007.	30
FIGURA 8. Níveis de GGT de ovinos do Grupo P, grupo M e Grupo G, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 15, 45 e 90 dias de crescimento respectivamente - Brasília, 2007.	31
FIGURA 9. Níveis de GGT individual de ovinos do grupo P, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 15 dias de crescimento - Brasília, 2007.	31
FIGURA 10. Níveis de GGT individual de ovinos do grupo M, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 45 dias de crescimento - Brasília, 2007.	32
FIGURA 11. Níveis de GGT individual de ovinos do grupo G, mantidos em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com 90 dias de crescimento - Brasília, 2007.	32
FIGURA 12. Ovino do grupo P. Intoxicação por <i>B. decumbens</i> . Hepatomegalia e distensão da vesícula biliar por acúmulo de bile. Observar a coloração amarelada e impressão das costelas na superfície do órgão - Brasília, 2007.	33

FIGURA 13. Fígado: A (animal do grupo P)- Macrófagos com citoplasma espumoso na luz de sinusóides (setas), alguns com imagens negativas de cristais aciculares, em ovino intoxicado (HE). B (animal do grupo P) - Necrose individual de hepatócitos (setas) em animal que morreu intoxicado por *B. decumbens* (HE) - Brasília, 2007. 33

FIGURA 14A (animal do grupo P) e B (animal do grupo M). Fígado: Presença de cristais na luz de ductos biliares (seta), ectasia, necrose do epitélio do ducto e discreto infiltrado mononuclear periductal em ovinos intoxicados (HE) - Brasília, 2007. 34

FIGURA 15. Fotomicrografia eletrônica do fígado de um ovino do grupo P, intoxicado pela *B. decumbens* mostrando hiperplasia de retículo endoplasmático liso (seta) e a imagem de um cristal de saponina (cabeça de seta) em hepatócito - Brasília, 2007. 34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sinais clínicos apresentados por ovinos durante o período experimental - Brasília, 2007.	25
TABELA 2. Níveis séricos médios e desvio padrão de AST (UI/dl) nos grupos P, M e G durante o experimento (semanas) - Brasília, 2007.	26
TABELA 3. Níveis séricos médios e desvio padrão de GGT (UI/dl) nos grupos P, M e G durante o experimento (semanas) - Brasília, 2007.	26
TABELA 4. Lesões histopatológicas observadas nos animais do experimento - Brasília, 2007.	27
TABELA 5. Concentração de protodioscina (%) na matéria seca nas amostras das pastagens do piquete P, M e G durante o experimento - Brasília, 2007.	35

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A *Brachiaria* spp. (Poaceae) é uma forrageira que ocupa mais de 50% da área cultivada no país, sendo de grande importância na alimentação de bovinos e ovinos no Centro-Oeste (DIAS et al., 2004; VIANA; BORGES, 2006). A importância desta gramínea reside no fato de sua fácil difusão, grande produção de massa verde em solos pobres, baixo custo de manutenção da área cultivada e resistente a longos períodos de estiagem (VIEIRA, 1977).

Após a introdução da forrageira na alimentação de bovinos e ovinos iniciaram-se casos de intoxicação com altos índices de mortes e perdas econômicas para os produtores (ANDRADE et al., 1975)

Ainda hoje, no Brasil, creditam à toxina esporidesmina, produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum* (Dematiaceae), a responsabilidade pelas lesões observadas nos animais intoxicados quando mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. (GÓRNIAK, 2008). As lesões causadas pelo fungo foram inicialmente descritas na Nova Zelândia, acometendo ovinos e sendo denominada de eczema facial (ALVARIZA, 1993; TOKARNIA, 2000). Porém, além das lesões histológicas distintas, há relatos sobre a ausência de esporos do fungo *P. chartarum* em surtos da intoxicação pela *Brachiaria* spp. em bovinos e ovinos (LEMOS et al., 1996; 1997; DRIEMEIER et al., 1998). Atualmente, sabe-se que o princípio tóxico presente na

Brachiaria spp., denominado saponina esteroideal litogênica, é o verdadeiro responsável pela intoxicação em ruminantes (CRUZ et al., 2000; KHAIRI et al., 2000; LEMOS et al., 2002; GOMAR et al., 2005).

Devido à expansão da ovinocultura na região Centro-Oeste, e sendo a *Brachiaria* spp. muito difundida nessa região e por todo o país, é de extrema importância para a criação extensiva de ruminantes minimizar as perdas por lesões e mortes causadas pela intoxicação por esta forrageira. Para isso um passo essencial, é a compreensão dos aspectos epidemiológicos e patológicos da intoxicação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Estima-se que o rebanho ovino no estado de Goiás e no Distrito Federal seja de 192.371 mil cabeças. A região do Centro-Oeste passou de 653.902 mil cabeças de ovinos em 1998 para 1.035.914 em 2007 e com a expectativa de um crescente aumento nos próximos anos (ANUALPEC, 2007).

A ovinocultura, antes vista como uma atividade de subsistência, atualmente destaca-se como uma atividade promissora em amplo desenvolvimento. O Centro Oeste juntamente com a região Nordeste, vem se destacando como grande fornecedor de carne ovina tanto para o mercado interno, como para o mercado externo (ANUALPEC, 2007).

A *Brachiaria decumbens* foi introduzida no Brasil em 1952 pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária Norte (IPEAN) (SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971; SEIFFERT, 1980). A importância desta gramínea no Brasil reside no fato da sua fácil difusão, grande produção de massa verde em solos pobres e pelo baixo custo de manutenção da área cultivada (VIEIRA, 1977). Além destas características, Vilela (1977) destaca a função desta gramínea no abafamento de invasoras.

No Distrito Federal, a braquiária constitui a principal opção de alimentação na ovinocultura, pois esta forrageira se tornou uma das únicas que resiste a condições adversas tais como solo ácido, pobre em nutrientes e escassez de chuvas por longos períodos (CASTRO, 2008).

As perdas econômicas causadas por plantas tóxicas são classificadas em diretas ou indiretas. Perdas diretas referem-se a mortes, malformações, abortos, baixo peso da carcaça ao abate e diminuição da produção de leite. As perdas indiretas refletem os gastos com o controle das plantas nas pastagens, manejo dos animais, compra de animais para substituição dos mortos, além dos custos com diagnóstico e no tratamento dos animais intoxicados (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; BARBOSA et al., 2007).

O Rio Grande do Sul possui um rebanho ovino estimado em 5 milhões de cabeças. Mortes de ovinos por plantas tóxicas atingem 7,2% do rebanho do estado (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). No Centro Oeste ainda não há dados acerca do impacto que as plantas tóxicas têm na ovinocultura (CASTRO, 2008).

No Distrito Federal a *Brachiaria decumbens* e a *Palicourea marcgravii* são plantas tóxicas que frequentemente causam intoxicações e mortes em ovinos e bovinos respectivamente (TOKARNIA, 2000).

A braquiária possui saponinas esteroidais litogênicas que são responsáveis pela intoxicação em ovinos e bovinos (GRAYDON et al., 1991; SALAM ABDULLAH et al., 1992; SMITH; MILES, 1993; LEMOS et al., 1997; DRIEMEIER et al., 1999).

As saponinas presentes na *Brachiaria decumbens* possuem uma parte lipofílica e outra parte hidrofílica composta por cadeias de açúcares, derivadas das sapogeninas diosgenina e yamogenina (CRUZ et al.; 2000). Estas substâncias, que após o metabolismo no trato digestório dos animais dão origem as sapogeninas epismilagenina e episarsasapogenina responsáveis pela formação dos cristais (figura 1) (LAJIS et al., 1993; MILES et al., 1994; MEAGHER et al., 2001; BRUM, 2006).

Brum (2006) relata que a maior concentração de saponinas ocorreria no período de queda das sementes, ou seja, no final do ciclo vegetativo. Siqueira-Souza et al (2005) fizeram avaliações sazonais da presença de isômeros de metilprotodioscina na forragem e concluíram que a *Brachiaria decumbens* apresenta concentrações do princípio tóxico capazes de intoxicar os animais durante todo o ano. Desta forma, intoxicações por esta forrageira poderia ocorrer em qualquer época do ano.

O termo fotossensibilização descreve a sensibilidade da pele a luz solar induzida por um agente fotodinâmico (YAGER; SCOTT, 1993; BRUM et al., 2007). É classificada em primária ou secundária. A fotossensibilização primária é caracterizada pela ingestão de compostos fotodinâmicos pré-formados, enquanto que a fotossensibilização secundária ou hepatógena ocorre por lesões hepáticas resultando em menor excreção da filoeitrina (YAGER; SCOTT, 1993). No Brasil, as principais plantas que causam fotossensibilização hepatógena são *Lantana* spp., *Brachiaria* spp., *Panicum maximum*, *Myoporum laetum*, além das leguminosas *Stryphnodendron* spp. e *Enterolobium* spp. (TOKARNIA, 2000; GRECCO et al., 2002; RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007).

Na fotossensibilização secundária ou hepática o agente fotoativo depositado na derme é a filoeitrina (CRUZ et al., 2000). A filoeitrina é formada a partir da degradação da clorofila pela microbiota do rumem. Devido à filoeitrina ser excretada

via bile, uma lesão hepática ou obstrução do fluxo biliar leva a uma retenção deste composto que em maior concentração no sangue, irá se depositar na pele (SALAM ABDHULLAH et al., 1992; KELLY, 1993; WISLOFF et al., 2002). A filoteritina depositada na pele quando exposta a radiação ultravioleta causa ruptura dos queratinócitos e destruição tecidual (STEGELMEIER, 2002).

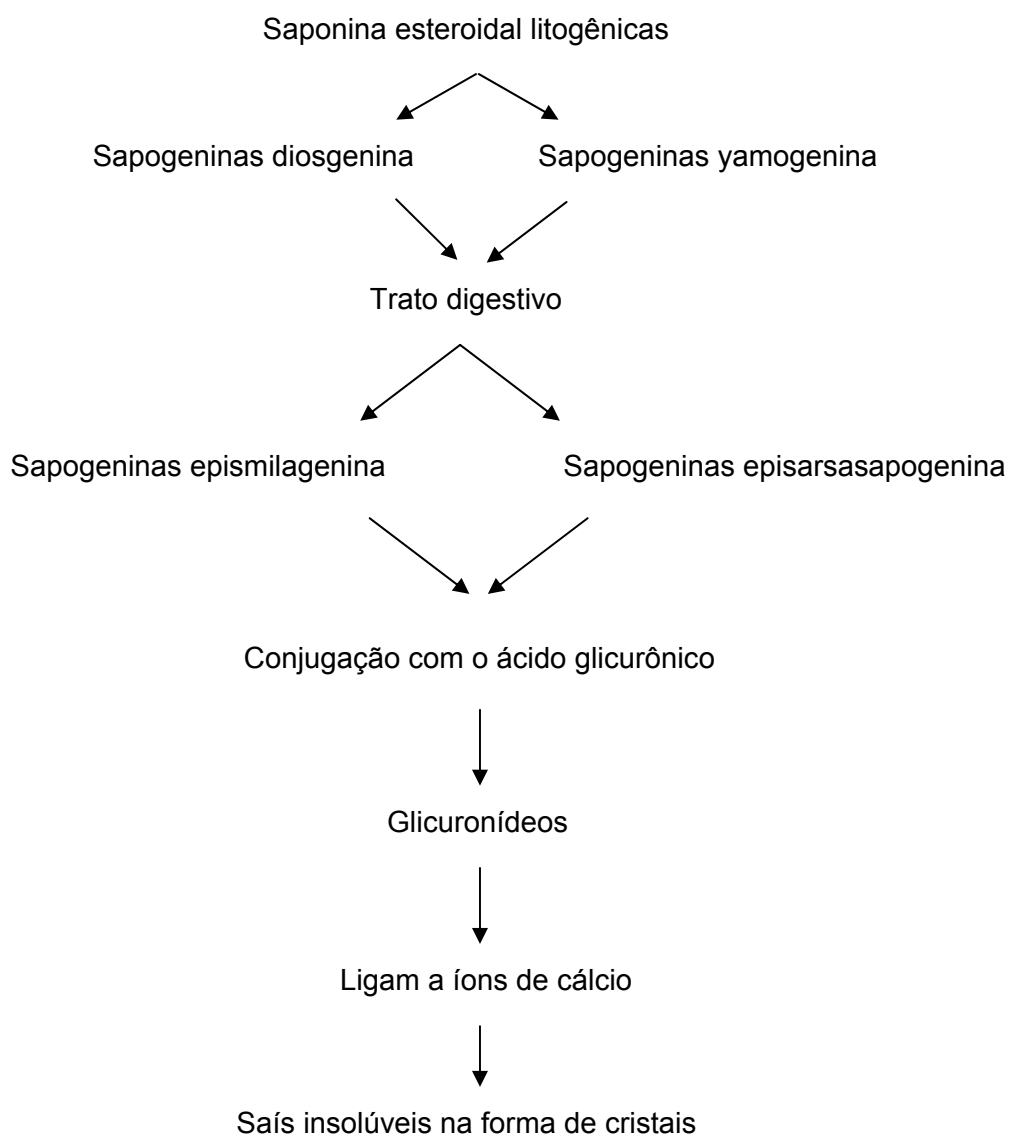


Figura 1. Mecanismo de formação dos cristais na intoxicação por *B. decumbens*

De acordo com os achados clínico-patológicos, a intoxicação pela *Brachiaria* spp. pode ser dividida em 4 formas: subclínica, aguda, crônica moderada e crônica grave (FAGLIARI et al., 1993b).

A forma subclínica caracteriza-se pela perda de peso e ausência de sinais clínicos característicos da intoxicação. Esta forma pode afetar até 64% do rebanho. Na forma crônica moderada, os sinais surgem de forma gradual, com lesões de pele e sem icterícia. Nesta forma as lesões regredem de oito a trinta dias após o início. Na forma crônica grave as lesões de pele aparecem na face e focinho de forma gradativa e é acompanhada de icterícia. A perda de peso torna-se mais evidente. A forma aguda caracteriza-se por lesões cutâneas superficiais com ausência de icterícia e a morte ocorre entre 2 a 5 dias após o início dos sinais clínicos (FIORAVANTI, 1999; GÓRNIAK, 2008). As lesões observadas na pele em casos de fotossensibilização incluem queda de pêlos, necrose, ulceração e crostas na pele despigmentada (TOKARNIA, 2000; PIMENTEL et al., 2007).

A icterícia frequentemente observada na intoxicação pela braquiária ocorre por duas formas. A primeira forma é resultante de alterações no metabolismo do hepatócito tendo como consequência a não conjugação da bilirrubina com o ácido glicurônico. A segunda forma ocorre devido à obstrução mecânica do fluxo biliar pelos cristais na luz de ductos (GRAYDON et al., 1991; KELLY, 1993; SANTOS et al., 2008).

Perda de peso em animais intoxicados pela planta ocorre devido às alterações no metabolismo do hepatócito associada à baixa ingestão de alimentos (DRIEMEIER et al., 1999). Outros sinais incluem a fotofobia, lacrimejamento, hiperemia de mucosa e intenso prurido de face. Estes sinais possivelmente resultam do aumento da sensibilidade a radiação solar induzida pela filoteritina (TOKARNIA, 2000).

À necropsia, observam-se hepatomegalia, vesícula biliar distendida e extensas áreas de fibrose hepática nos casos crônicos (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007; SANTOS et al., 2008). Os linfonodos mesentéricos e hepáticos podem apresentar estriações esbranquiçadas dispostas em forma radiada no córtex em direção a medular (DRIEMEIER et al., 1998).

Os achados microscópicos no fígado de animais intoxicados por braquiária consistem em aglomerados de macrófagos com o citoplasma espumoso, localizados principalmente ao redor das vênulas centrolobulares. Células gigantes multinucleadas também podem ser observadas no parênquima hepático (GOMAR et al., 2005; BRUM et al., 2007). Frequentemente há imagens negativas de cristais

aculiformes no citoplasma de macrófagos e hepatócitos. Estes cristais assemelham-se a fendas de colesterol (GRAYDON et al., 1991; DRIEMEIER et al., 1999).

Os cristais também são observados na luz de ductos biliares. O mecanismo de formação destes cristais possivelmente ocorre no trato digestório pela hidrólise dos açúcares das saponinas, redução da dupla ligação do radical 3- β -OH para 3- α -OH e posterior conjugação com o ácido glicurônico. Desta conjugação e posterior associação ao cálcio formam-se os cristais (MILES et al., 1991). A deposição de cristais na luz de ductos biliares resulta em obstrução do fluxo biliar e conseqüente colestase (SANTOS et al., 2008). Macrófagos espumosos também são visualizados no baço e em linfonodos hepáticos e mesentéricos (DRIEMEIER et al., 1998; 2002).

Outros achados histológicos observados principalmente em bovinos intoxicados incluem a tumefação de hepatócitos, necrose individual de hepatócitos, proliferação de ductos biliares e fibroplasia periportal (SMITH; MILES, 1993; LEMOS et al., 1996; TOKARNIA, 2000; ECCO et al., 2004).

A análise das enzimas séricas AST e GGT é um importante parâmetro a ser observado em casos de intoxicação pela braquiária (BRUM, 2006). A aspartatoaminotransferase (AST) é uma enzima encontrada no citoplasma e na mitocôndria dos hepatócitos, células musculares estriadas esquelética e cardíaca (WISLOFF et al., 2002). A gama- glutamiltransferase (GGT) está presente na membrana plasmática de células do epitélio dos ductos biliares e seus níveis elevados na circulação são observadas em lesões hepáticas e colestase (TENNANT, 1997)

Na avaliação das alterações ultra-estruturais nos casos de intoxicação pela *Brachiaria* spp. observa-se proliferação do retículo endoplasmático liso e presença de cristais aciculares recobertos parcialmente ou totalmente por membrana no citoplasma de hepatócitos. No citoplasma de macrófagos também podem ser visualizados cristais em agrupamentos recobertos por membrana (DRIEMEIER et al., 1998).

Apesar de todas as evidências e fundamentos, ainda paira, tanto no meio acadêmico e técnico, como também junto aos produtores rurais, dúvidas quanto a real etiologia da intoxicação por braquiária além de formas de prevenção e controle.

Este trabalho foi desenvolvido visando sanar parte destes questionamentos e para propor no futuro, soluções viáveis à utilização da forrageira que tem importância vital à toda pecuária nacional.

OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo investigar a relação entre a fase de crescimento da *Brachiaria decumbens* e a toxicidade desta gramínea. Os resultados desta pesquisa pretendem servir de base para elaborar estratégias visando minimizar as perdas econômicas na ovinocultura do Centro-Oeste, devido a intoxicação pela *Brachiaria decumbens*, através do manejo desta forragem e dos animais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a toxicidade dos diferentes estágios de crescimento da *B. decumbens* em ovinos;
- Avaliar os sinais clínicos da intoxicação e níveis séricos das enzimas AST e GGT de ovinos mantidos em pastos de diferentes estágios de crescimento.
- Correlacionar às lesões anatomopatológicas nos animais intoxicados;
- Caracterizar os níveis de saponina (protodioscina) em pastagens de *Brachiaria decumbens* em diferentes estágios de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ALVARIZA, F. R. Intoxicação por *Pithomyces chartarum*. In: Riet-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. D. C.; SCHILD, A. L. Intoxicação por plantas e micotoxícoses em animais domésticos. Hemisfério Sul do Brasil: Pelotas. 1993, p.93-101.
- ANDRADE, S. A.; NOTHENBERG, M.S.; RETZ, L.; BUENO, P.C. Estudo sobre cobaias alimentadas com *Brachiaria* sp. (Tanner Grass). *Biol.* v.42, p. 243-246, 1975.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC). FNP Consultória e Comércio, São Paulo, Brasil. 2007. 332p.
- BARBOSA, R.R.; FILHO, M.R.R.; SILVA, I.P.; SOTO-BLANCO, B. Plantas tóxicas de Interesse Pecuário: Importância e Formas de Estudo. *Act. Vet. Bra.*, v.1, p.1-7, 2007.
- BRUM, K. B. Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistemas de pastejo. Goiânia: UFG, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2006. 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)
- BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS R.A.A.; RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M.C.S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.39-42, 2007.
- CASTRO, M.B. - comunicação pessoal - Lab. Patol. Vet. - Universidade de Brasília, DF, 2008.
- CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V.S.; COLODEL, E. M.; TAKETA, A..T.C.; SCHENKEL, E. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.42, p.142-145, 2000.

DIAS, M. J.; DIAS, D. S. O.; BRITO, R. A. M. Potencialidades da produção de ovinos de corte em Goiás. In: V simpósio da sociedade brasileira de melhoramento animal, 2004, Pirassununga: Anais...São Paulo.

DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; SEITZ A.L.; BARROS, S.S.; CRUZ, C.E.F. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon.*, v.40, p.1027-1031, 2002.

DRIEMEIER, D.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos ("foam cells"). *Pesq. Vet. Bras.*, v.18, p. 29 - 34, 1998.

DRIEMEIER, D.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. Relação entre macrófagos espumosos ("foam cells") no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp. no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.19, p.79-83, 1999.

ECCO, R.; SANTOS JR, H.L.; TÚRY, E. & JACOBINA, G.C. Intoxicação crônica por *Brachiaria* spp. em Bovinos. 2004. *Pesq. Vet. Bras.*, 24(supl.):19-20.

FAGLIARI, J.J.; PASSIPIERI, M.; KUCHEMUCK, M.R.G. E CURI, P.R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporodesmina. II. Aspectos clínicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.45, p. 275-282, 1993b.

FIORAVANTE, M.C.S. Incidência, avaliações clínicas, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporodesmina em bovinos. 1999. 256f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista, Botucatu.

GOMAR, M.S.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; GIMENO, E.J. Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* spp. *J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.52, p.18-21, 2005.

GÓRNIAK, S.L. Plantas Tóxicas de Interesse Agropecuário. In: SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária. 1ed. São Paulo: Manole. v.1, cap. 15, 2008. p.415-458.

GRAYDON, R.I.; HAMID, H.; ZAHARI, P. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. Aust. Vet. J., v.68, p.234-236, 1991.

GRECCO, F.B.; DANTAS, F.A.M.; RIET-CORREA, F.; LEITE, C.G.D.; RAPOSO, J. CATTLE intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. Vet. Human. Toxicol., v.44, p.160-162, 2002.

KELLY, W.R. The Liver and Biliary System. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals. v.2, 4 ed. Academic Press: California. 1993. 747p.

KHAIRI, H.M.; ELSHEIKH, H.A.; ABDULLAH, A.S. The Effect of Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) on Drug-Metabolizing Enzymes in Sheep and Comparison with Normal Cells. Vet. Human. Toxicol., v.42, p.193-195, 2000.

LAJIS, N.H.; ABDULLAH, A.S.; SALIM, S.J.; BREMNER, J.B.; KHAN, M.N. Epi-sarsasapogenin and epi-smilagenins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. Steroids. v.58, p.387-9, 1993.

LEMOS R.A.A.; PURISCO E. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena. In: LEMOS, R.A.A.; BARROS, N.; BRUM, K.B. Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: Perguntas e respostas. Campo Grande:UFSM. 2002. 292p.

LEMOS, R.A.A.; FERREIRA, L.C.L.; SILVA, S.M.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. Ciência Rural, v.26, p.109-113, 1996

LEMOS, R.A.A.; SALVADOR, S.C.; NAKAZATO, L. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.39, p. 376-377, 1997.

MEAGHER, L. P.; SMITH, B. L.; WILKINS, A. L. Metabolism of diosgenin-derived saponins: implications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminants. *An. Feed Sci. and Tecno.*, v.91, p. 157-170, 2001.

MILES, C.O.; WILKINS, A.L.; ERASMUS, G.L.; KELLERMAN, T.S.; COETZER, J.A. Photosensitivity in Soth Africa. VII. Chemical composition of biliary crystals from a sheep with experimentally induced geeldikkop. *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, v.61, p.215-22, 1994.

PIMENTEL, L.A.; RIET-CORREA, F.; GUEDES, K.M.R.; MACEDO, J.T.S.A.; MEDEIROS, R.M.T. e DANTAS, A.F.M. Fotossensibilização primária em eqüídeos e ruminantes no semi-árido causada por *Froelichia humboldtiana* (Amaranthaceae). *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p. 23-28, 2007.

RIET-CORREA F.; MEDEIROS R.M. Intoxicações por plantas no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle, e riscos para a Saúde Pública. *Pesq. Vet. Bras.*, v.21, p.38-42, 2001.

RIET-CORREA, F. & MÉNDEZ, M.D.C. Intoxicações por Plantas e Micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. *Doenças de Ruminantes e Eqüídeos*. Santa Maria: Palotti. 3ed. v.2. 2007. p.99-221.

SALAM ABDULLAH, A.; LAJIS, N.H.; BREMNER, J.B.; DAVIES, N.W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M.A. *Decumbens* intoxicated sheep. *Vet. and Hum. Toxicol.*, v.34, p.154-155, 1992.

SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V. & BARROS, C.S.L.. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas

hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesq.Vet. Brás.*, v.28, p.1-14, 2008.

SEIFFERT, N.F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. EMBRAPA-CNPGC - Campo Grande. Circular Técnico, n.1, 1980. 83p.

SERRÃO, E.A.D. & SIMÃO NETO, M. Informação sobre duas espécies de gramínea forrageira do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *Bruzziensis* Germain et Evrard. Belém, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, v.2, 1971. 31p.

SIQUEIRA-SOUZA, V.; SANDRINI, C.N.M.; FIORAVANTI, M.C.S.; HARAGUCHI, M. Avaliação sazonal das saponinas nas pastagens de *Brachiaria* e *Andropogon* do Centro-Oeste Brasileiro. *Arq. Inst. Biol.*, 72(supl 1), p. 49, 2005.

SMITH B.L.; MILES C.O. A role for *Brachiaria decumbens* photosensitization of ruminants. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.35, p.256-257, 1993.

STEGELMEIER, B.L. Equine Photosensitization. *Clinical Techniques in Equine Practice*. v. 2, 2002. p.81-88.

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed. London: Academic Press, 1997. p.327-352.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J & PEIXOTO, P.V. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Helianthus: Rio de Janeiro, 2000, 310 p.

VIANA, R.O.; BORGES, I. Ovinos na Braquiária. *Revista Brasileira de Caprino & Ovinos: O berro*. n.96, p.94-98, 2006.

VIEIRA, J. M. Espaçamento e densidade de semeadura de *Brachiaria decumbens* Stapf para a formação de pastagens. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós”, 1977. 160p.

VILELA, H. Formação de pastagens. Belo Horizonte, EMATER, 1977. 29p. (EMATER. Circular, 1).

WISLOFF, H.; WILKINS, A.L.; SCHEIE, E. AND FLAOYEN, A. Accumulation of Sapogenin Conjugates and Histological Changes in the Liver and Kidneys of Lambs Suffering from alveld, a Hepatogenous Photosensitization Disease of Sheep Grazing *Nartheccium ossifragum*. Vet. Res. Com., v.26, p381-396, 2002.

YAGER, S.A.; SCOOT, D.W. The skin and appendages. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals. 4ed. San Diego: Academic, 1993. v.2, cap. 5, p.531-738.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO

A intoxicação pela gramínea *Brachiaria* spp. tem sido relatada em bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos e eqüinos (ALVARIZA et al., 1993; TOKARNIA, 2000; CRUZ et al., 2001; BRUM et al., 2007). Ovinos são mais sensíveis que bovinos, e entre os ovinos, os jovens são mais susceptíveis a intoxicação (KHAIRI et al., 2000; SANTOS et al., 2008).

Os animais podem se intoxicar em qualquer fase do desenvolvimento da braquiária, porém, no período de brotação das pastagens, ocorre um maior número de surtos (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007). Alguns casos de intoxicação em pastos vedados por mais de 30 dias têm sido relatados (BRUM, 2006). Vários surtos em ruminantes, especialmente em ovinos, vêm sendo descritos no Centro-Oeste, especialmente no início do período chuvoso, porém os fatores que possam influenciar na toxicidade da gramínea são pouco conhecidos (CASTRO et al., 2007; CASTRO, 2008. Comunicação pessoal).

A esporidesmina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum* foi inicialmente descrita como causa da intoxicação nas pastagens de braquiária. Autores relatam a necessidade de aproximadamente 100.000 esporos do fungo para que ocorra a intoxicação. Em surtos observados no Brasil, houve ausência de esporos do fungo, indicando desta forma, que o princípio tóxico estava presente na própria *Brachiaria* spp. (DIMENNA ; BAILEY, 1973; LEMOS et al., 1996; 1997; DRIEMEIER et al., 1998; TOKARNIA, 2000). Atualmente sabe-se que saponinas esteroidais litogênicas compõe o princípio tóxico presente na *Brachiaria decumbens*, responsável por casos fotossensibilização hepatógena e morte dos animais (GRAYDON et al., 1991; SMITH; MILES, 1993; MEAGHER et al., 1996; LEMOS et al., 1997; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). Estas saponinas são originadas das sapogeninas diosgenina e yamogenina, No trato digestório dos animais, especialmente no rúmen, estas sapogeninas transformam-se em epismilagenina e a episarsasapogenina (MEAGHER et al., 1996; BRUM, 2006)

Os hepatócitos podem apresentar disfunção devido a ação da saponina esteroidal, interferindo na metabolização e excreção da filoeitrina. Esta substância se deposita na pele, que ao entrar em contato com a radiação ultra-violeta, causa ruptura de queratinócitos, liberação das enzimas lisossomais e destruição tecidual (KELLY, 1993; STEGELMEIER, 2002). A icterícia e as lesões cutâneas são os principais sinais clínicos observados em casos de intoxicação pela *Brachiara* spp. (KELLY, 1993; BARBOSA et al., 2006). Os principais achados macroscópicos de animais intoxicados são a hepatomegalia associada à distensão da vesícula biliar (DRIEMEIER et al., 1999).

Na microscopia óptica, a tumefação e necrose individual de hepatócitos são freqüentemente observadas. Macrófagos com o citoplasma espumoso dispostos de forma aleatória pelo parênquima hepático e linfonodos mesentérico e hepático são também descritos. Com frequência são visualizadas imagens negativas de cristais aculiformes na luz de ductos biliares e citoplasma de hepatócitos em animais intoxicados (SALLAN ABDULLA et al., 1992; MEAGHER et al., 1996; GOMAR et al., 2005). Outros achados incluem fibroplasia, colestase e presença de infiltrado mononuclear periportal (LEMOS et al., 1997; TOKARNIA, 2000; ECCO et al., 2004). Na microscopia eletrônica há hiperplasia de retículo endoplasmático liso associada a presença de material cristalóide no interior de hepatócitos (DRIEMEIER et al., 1998).

O desconhecimento a respeito dos fatores envolvidos na intoxicação por braquiária limita o desenvolvimento de estratégias adequadas para utilização segura da forrageira. É de extrema importância conhecer os níveis do princípio tóxico na gramínea, a influência do estágio de crescimento vegetativo da planta nas concentrações de saponina, e ainda, os fatores envolvidos na susceptibilidade ou resistência dos animais à intoxicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Neste experimento foram utilizados 21 ovinos, machos, com 4 meses de idade, divididos em três lotes, de sete animais (n=7) cada. Estes animais eram provenientes de criatórios onde nunca tiveram contato prévio com pastagens de *Brachiaria spp.* Além da forragem, os animais receberam 200 gramas de ração comercial por dia, sal mineral e água *ad libitum*. O experimento foi desenvolvido em piquetes situados em uma propriedade em Brazlândia (S15 46'108" W48 11'318"), cidade satélite localizada no Distrito Federal. Esta propriedade possuía um terreno plano, com predominância de latossolo vermelho e regime de chuvas constante durante o período experimental. Havia ocorrido previamente surtos de fotossensibilização em ovinos desta mesma propriedade e mantidos na pastagem utilizada para o experimento (CASTRO, 2008).

Piquetes

Os animais do experimento foram mantidos em três piquetes de meio hectare cada, identificados com as letras P, M e G. Os três piquetes foram roçados no dia 0. Aos quarenta e cinco dias, o piquete M e P foram novamente roçados, e 30 dias após, apenas o piquete P sofreu nova roçada. Na seqüência, decorridos quinze dias, o experimento teve início com a introdução dos animais. Desta forma, os piquetes apresentaram 90 dias (grupo G), 45 dias (grupo M) e 15 dias (grupo P) de crescimento da forrageira, respectivamente. Os animais foram identificados com coleiras coloridas caracterizando o grupo ao qual pertenciam (grupo P - coleira azul, grupo M - coleira amarela e grupo G - coleira vermelha). A avaliação experimental compreendeu o período de março a maio de 2007.

Avaliação clínica dos animais

Os animais foram submetidos a um exame clínico três vezes por semana, em intervalos de um dia e observou-se, entre outros: apatia, emagrecimento, alterações cutâneas, fotofobia, além da inspeção das mucosas ocular e oral.

Exames bioquímicos

Os níveis plasmáticos das enzimas aspartatoaminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT) foram avaliados semanalmente. Para tal o sangue era centrifugado para obtenção do soro. A metade do soro amostrado era utilizada para mensuração das enzimas e a outra fração era congelada como garantia dos resultados e posterior análise. A mensuração das enzimas foi realizada no laboratório de patologia clínica da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB. Para análise das enzimas séricas foram utilizados kits comerciais (Labtest®) e a leitura realizada em espectrofotômetro digital (Celm® SB-190).

Biópsia hepática

Os ovinos que apresentavam sinais clínicos da intoxicação eram retirados do experimento para evitar a morte dos mesmos, e realizava-se a biópsia hepática guiada por ultra-som (AMORIM et al., 2003). Para realização do procedimento foi realizada anestesia local com lidocaína a 2% na região do décimo primeiro espaço intercostal do lado direito. A anti-sepsia local com álcool iodado foi feita antes da incisão na pele e introduzida a agulha de biópsia (super core II 14X20CM MD-TECH®) na cavidade abdominal em sentido crânio-ventral guiada pela imagem ultrassonográfica. Foram retiradas três amostras de fígado por animal. Destas, duas foram fixadas em formol tamponado a 10%, e outra colocada em gluteraldeído (fixador) para a realização da microscopia eletrônica (DRIEMEIER et al., 1998). As amostras fixadas em formol a 10%, foram processadas rotineiramente, incluídas em parafina, realizados cortes de 5 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscopia de luz.

Necropsia

Os animais que morreram durante o período experimental eram necropsiados e fragmento dos órgãos foram fixados em formol a 10%, processadas rotineiramente, incluídas em parafina, realizados cortes de 5 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscopia de luz.

Amostras de capim

Amostras das pastagens dos três piquetes foram colhidas à altura de pastejo, de 10 locais diferentes dos piquetes nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 para análise dos níveis de saponinas na pastagem e contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*. Para a contagem do número de esporos de *Pithomyces chartarum* nas pastagens de *Brachiaria decumbens* foi empregado o método de lavagem (“wash method”) em amostras frescas da gramínea (TOKARNIA et al., 1979). Neste processo foi adicionado dez vezes o volume de água a quantidade em gramas da planta e agitado. Posteriormente os esporos com características morfológicas do *P. chartarum* eram contados em câmara de Neubauer. Para cada esporo observado por 2 mm³ era multiplicado por 5000. Também foi realizada a secagem da forrageira para posterior análise dos teores de saponinas. Nestas amostras foi determinado qualitativa e quantitativamente o teor de saponinas pelo método de cromatografia de camada delgada e por HPLC utilizando o detector de evaporação por dispersão de luz (Evaporative Light Scattering Detector) (GJULEMETOWA et al., 1982).

Análise estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos valores de GGT, AST e dos níveis de protodioscina, e empregado o teste de Tukey para a comparação das médias com o programa Prism 4.0 (GraphPad®).

RESULTADOS

Dos 21 ovinos deste experimento, 12 animais apresentaram os sinais da intoxicação e foram retirados do experimento (taxa de morbidade=57,14%) e 9 ovinos dos 12 intoxicados morreram (mortalidade=75,00%). Mesmo após os ovinos terem sido retirados das pastagens com o surgimento dos sinais clínicos, ocorreu a morte de 4 animais do grupo P (44,44%), 3 animais do grupo M (33,33%) e 2 animais do grupo G (22,23%). Os outros 3 ovinos que adoeceram, (1 animal de cada grupo) se recuperaram completamente da intoxicação.

Os principais sinais clínicos observados nos ovinos intoxicados neste experimento são apresentados na tabela 1. Sinais clínicos característicos da fotossensibilização hepatógena como queda de pêlo, erosões e ulcerações na pele foram observados em apenas um ovino que apresentava pelagem clara (figura 2). Este animal se intoxicou em 10 dias após o início do experimento e se recuperou completamente das lesões. Nenhum ovino de pelagem escura (14/21) apresentou lesões ulcerativas/erosivas na pele durante o experimento.

De acordo com os achados clínicos observados classificou-se a intoxicação nas formas hiperaguda, aguda, crônica e subclínica.

A forma hiperaguda da intoxicação ocorreu entre 7 a 10 dias após o contato do animal com a forrageira e caracterizou-se pelo aparecimento abrupto dos sinais clínicos como edema de face e orelha (Figura 3), hiperemia de mucosa, secreção ocular, apatia e ausência de icterícia. Esta forma foi observada em 3 ovinos (3/21 - dois animais do grupo P e um animal do grupo M) que morreram rapidamente após o aparecimento dos sinais.

A forma aguda ocorreu entre 10 e 60 dias após o contato com a forrageira, com a morte de vários animais (6/21 - dois animais do grupo P, dois animais do grupo M e dois animais do grupo G). Os principais sinais clínicos apresentados foram hiperemia de mucosa ocular, que precedia icterícia, apatia e emagrecimento progressivo.

Três ovinos apresentaram a forma crônica, no período entre 23 e 60 dias, caracterizada pelo emagrecimento progressivo, hiperemia da mucosa ocular e aumento dos níveis séricos de AST e GGT (um animal do grupo P, M e G). Todos os animais se recuperaram ao término do experimento.

Na forma subclínica, os animais apresentaram somente aumento das enzimas séricas hepáticas, porém, sem quaisquer manifestações clínicas (9/21).

Os níveis séricos de AST durante o experimento estão dispostos na tabela 2 e representados na figura 4. O maior aumento da enzima sérica AST ocorreu no grupo P e M na segunda semana após o início do experimento, enquanto que no grupo G, ocorreu elevação gradual, havendo o pico na sétima semana. Os níveis de AST por grupos estão representados nas figuras 5, 6 e 7.

Animais dos três grupos apresentaram elevação desta enzima, demonstrando a hepatotoxicidade em todas as fases de crescimento da forrageira. Porém, os animais que apresentaram uma elevação gradual ou mesmo uma queda com posterior elevação desta enzima, demoraram mais para se intoxicarem ou não se intoxicaram.

Os níveis séricos de GGT durante o experimento estão dispostos na tabela 3 e representados na figura 5. Em relação à mensuração sérica da GGT, o pico ocorreu no grupo P e M na segunda semana do início do experimento. No grupo G, houve a elevação máxima na quarta semana. Os níveis de GGT por grupo estão representados nas figuras 9,10 e 11.

Os ovinos que morreram durante o experimento e foram necropsiados (9/21) apresentaram icterícia (6/9), variando de discreta (4/9) a moderada (2/9). Um achado constante foi a hepatomegalia, com presença da impressão das costelas no órgão e distensão da vesícula biliar (9/9) (figura 12). Nos demais órgãos, e principalmente, rins, linfonodos hepáticos e mesentéricos, não foram observadas alterações macroscópicas.

Os achados microscópicos observados no fígado dos animais nos quais foi realizada a biópsia ou dos ovinos necropsiados estão representados na tabela 4.

Na análise microscópica, tanto nas biópsias hepáticas quanto no fígado dos animais necropsiados, observou-se tumefação de hepatócitos, macrófagos com citoplasma espumoso no interior de sinusóides distribuídos difusamente (Figura 13), discreta colestase (12/21), proliferação de ductos biliares (15/21) e infiltrado inflamatório mononuclear periportal (2/21) que variava de discreto a moderado. A fibroplasia foi mais intensa nos animais que se intoxicaram com a forma crônica (3/21). Foram visualizados discretos aglomerados multifocais aleatórios de neutrófilos em dois animais do grupo P que apresentaram a forma hiperaguda.

Constatou-se necrose individual de hepatócitos em 2 animais do grupo P e um do grupo M, que apresentaram a forma hiperaguda, além de um animal (grupo P) com a forma aguda. Todos estes animais morreram durante o experimento.

No citoplasma de alguns macrófagos e de hepatócitos havia imagens negativas de estruturas cristalóides aciculares. Também foi observada a imagem negativa de material cristalóide na luz de ductos biliares e necrose do epitélio dos ductos (figura 14a e 14b) nos três ovinos que apresentaram a forma hiperaguda da intoxicação e que não demonstraram icterícia.

Os animais que não apresentaram lesões acentuadas e difusas pelo parênquima hepático, e que não foram visualizados cristais na luz de ductos biliares (12/21), também não apresentaram icterícia.

Foi constatada degeneração hidrópica das células epiteliais de túbulos renais (3/9), enquanto que nos linfonodos hepáticos, nos três animais que se intoxicaram na forma hiperaguda e em um animal da forma aguda, havia macrófagos espumosos com imagens negativas aculiformes em seu citoplasma (4/9).

A principal alteração observada na microscopia eletrônica de fragmentos hepáticos foi a marcante hiperplasia de retículo endoplasmático liso nos hepatócitos (n=4 - um animal do grupo P, dois do grupo M e um do grupo G) e a presença de cristais aculiformes envoltos por membranas no interior do citoplasma (Figura 15). Macrófagos, com citoplasma de aspecto espumoso, também apresentaram estruturas cristalóides semelhantes às encontradas nos hepatócitos.

Os níveis de protodioscina (saponina) nas amostras de capim colhidas durante o experimento estão representados na tabela 5. Os níveis de protodioscina durante o experimento foram maiores no piquete P e M em relação ao grupo G ($p \leq 0,05$), porém, não diferiram entre si.

Nas colheitas do capim para contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*, os resultados foram iguais ou menores que 5000 esporos/g de pastagem fresca, em todas as amostras durante todo o experimento.

Tabela 1. Sinais clínicos apresentados por ovinos durante o período experimental - Brasília, 2007.

ANIMAL	SINAIS CLÍNICOS											
	APT	EDF	EDO	EMG	EUP	FTF	HMO	SCO	ICT	MRT	EC	PI
P01	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
P02	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3	7
P03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P04	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	7
P05	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	4	33
P06	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	2	10
P07	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	3	33
M01	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
M02	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	1	12
M03	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	3	7
M04	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M05	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
M06	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	4	12
M07	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	18
G01	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
G02	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	3	31
G03	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	45
G04	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	2	15
G05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G07	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-

APT: apatia; EDF: edema de face; EDO: edema de orelha; EMG: emagrecimento; EUP: erosão e ulceração de pele; FTF: fotofobia; HMO: hiperemia da mucosa ocular; SCO: secreção ocular; ICT: icterícia; MRT: morte; EC: evolução clínica em dias até a morte; PI: Período em dias do início dos sinais clínicos da intoxicação. Sinais clínicos: - Ausência; + Presença.

Tabela 2. Níveis séricos médios e desvio padrão de AST (UI/dl) nos grupos P, M e G durante o experimento (semanas) - Brasília, 2007.

SEMANAS	P	M	G
0	123,7±33,9 n=7	155,9±40,2 n=7	151,2±44,1 n=7
1	152,8±65,2 n=7	168,7±69,6 n=7	141,6±30,5 n=7
2	576,6±1055,8 n=6	261,0±292,4 n=7	111,4±11,1 n=7
3	142,0±48,6 n=4	197,2±136,1 n=5	144,0±54,5 n=7
4	157,3±30,6 n=4	249,3±221,8 n=4	253,8±247,1 n=7
5	154,1±16,1 n=3	109,5±25,1 n=3	204,2±128,9 n=6
6	122,5±9,6 n=3	139,2±19,3 n=3	290,7±169,4 n=5
7	204,2±93,2 n=3	154,1±8,5 n=3	300,8±254,5 n=5
8	130,9±43,3 n=2	146,6±3,2 n=3	143,4±30,2 n=4
9	119,7±19,7 n=2	141,1±14,0 n=3	200,5±182,0 n=4

Tabela 3. Níveis séricos médios e desvio padrão de GGT (UI/dl) nos grupos P, M e G durante o experimento (semanas) - Brasília, 2007.

SEMANAS	P	M	G
0	26,7±11,8 n=7	31,2±8,1 n=7	43,1±11,3 n=7
1	82,2±44,5 n=7	84,1±49,7 n=7	58,4±12,5 n=7
2	82,3±43,0 n=6	64,1±72,0 n=7	39,4±24,1 n=7
3	99,7 ±61,8 n=4	117,6±74,3 n=5	93,0±71,21 n=7
4	72,7 ±54,1 n=4	81,7±52,2 n=4	158,2±162,1 n=7
5	103,2±64,4 n=4	29,3±9,6 n=3	111,8±77,5 n=6
6	95,0±58,31 n=4	23,6±13,2 n=3	64,4±43,0 n=5
7	50,0±19,0 n=3	42,0±3,4 n=3	134,2±78,0 n=5
8	47,0±31,1 n=2	23,0 ±3,4 n=3	79,0±61,2 n=4
9	31,0±0,0 n=2	19,0 ±0,0 n=3	94,7±47,5 n=4

Tabela 4. Lesões histopatológicas observadas nos animais do experimento - Brasília, 2007.

Animais	B/N	TVH	CIH	NIH	PDB	RB	FBP	IMP	MOE	MOC	CG	DER	Outros
P01	B	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
P02	N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P03	B	++	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P04	B	+++	+	+	++	+	-	+	++	++	+	+	Presença de focos de neutrófilos no parênquima hepático; cristais em ductos biliares e no citoplasma de macrófagos em linfonodo.
P05	N	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
P06	N	+++	+	+	+	++	-	+	+	++	+	+	Acúmulos focais de neutrófilos e cristais em ductos biliares e citoplasma de macrófagos em linfonodo.
P07	N	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
M01	B	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M02	N	++	+	+	+	++	-	++	+	+	-	+	Presença de cristais em ductos biliares e citoplasma de macrófagos em linfonodo.
M03	N	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
M04	B	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M05	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M06	N	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M07	B	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
G01	B	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
G02	N	++	-	-	+	+	-	++	+	-	+	-	-
G03	B	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
G04	N	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
G05	B	+	-	-	++	+	+	+	+	-	-	-	-
G06	B	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G07	B	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-

B/N: Biópsia e Necropsia;TVH: Tumefação e vacuolização de hepatócitos; CIH: Cristais no interior de hepatócitos; NIH: Necrose individual de hepatócitos; PDB: Proliferação de ductos biliares; RB: Retenção Biliar; FBP: Fibroplasia; IMP: Infiltrado mononuclear periportal; MOE: Macrófago com citoplasma espumoso; CG: Células Gigantes; DER: Degeneração de células em túbulos renais. Avaliação histopatológica: - Ausência; + Leve; ++ Moderada e +++ Intensa



Figura 2. Ovino do grupo P intoxicado por *B. decumbens* apresentando lesões decorrentes a fotossensibilização nas áreas claras da pele - Brasília, 2007.



Figura 3. Ovino do grupo P intoxicado demonstrando severo edema de face e orelha - Brasília, 2007.

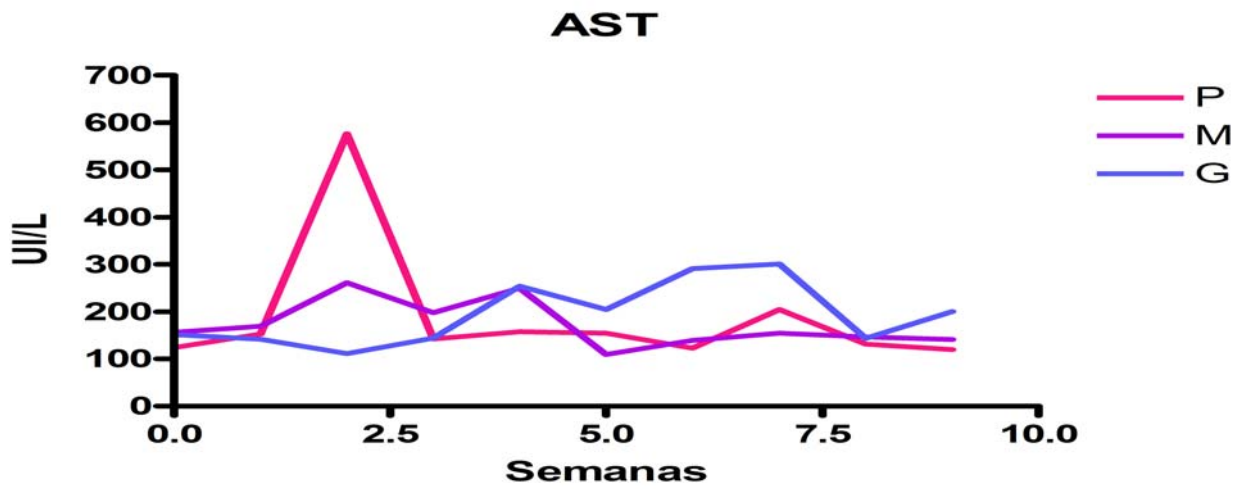


Figura 4. Níveis médios de AST de ovinos do grupo P, grupo M e grupo G, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com 15, 45 e 90 dias de crescimento respectivamente - Brasília, 2007.

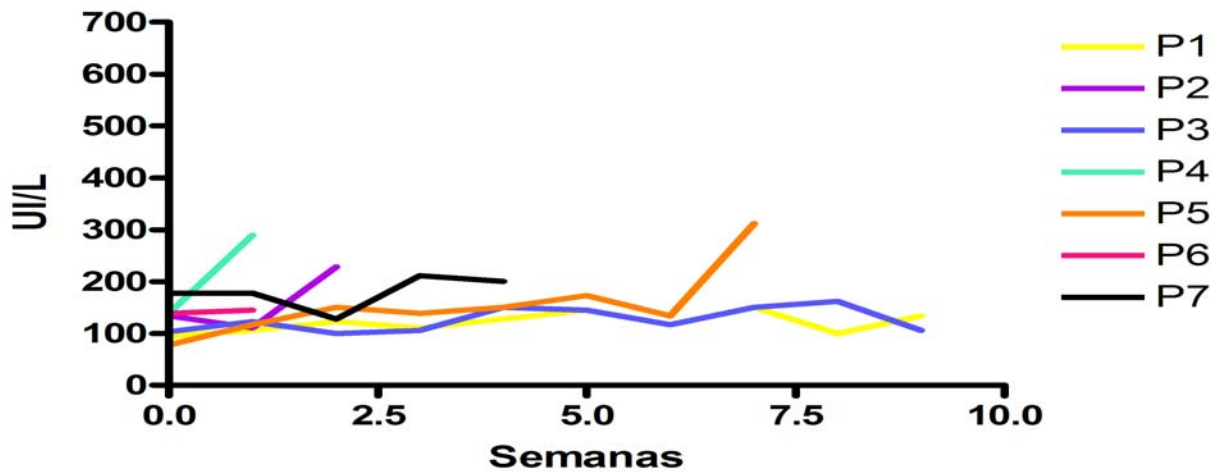


Figura 5. Níveis de AST individual dos ovinos do grupo P, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com 15 dias de crescimento - Brasília, 2007.

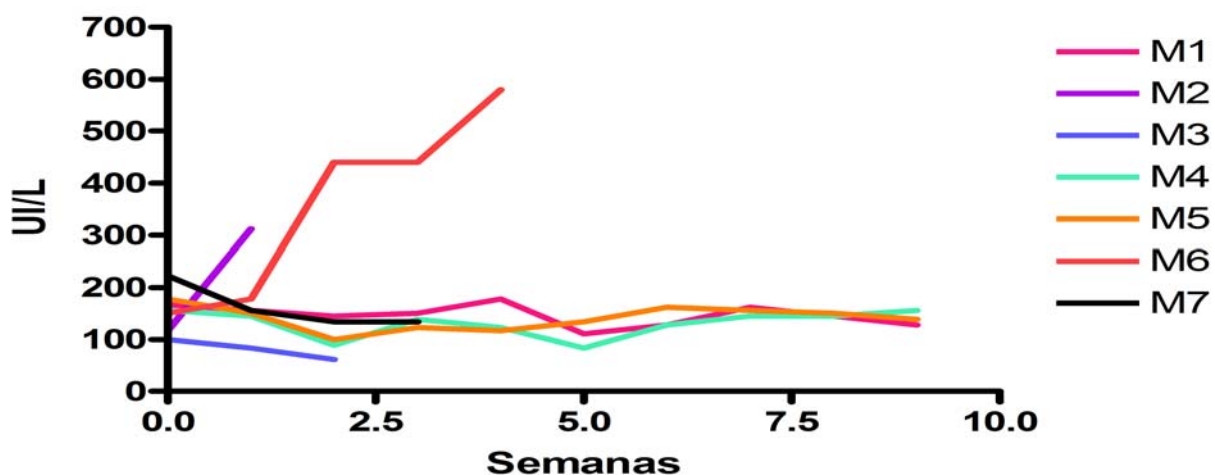


Figura 6. Níveis de AST individual dos ovinos do grupo M, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com 45 dias de crescimento - Brasília, 2007.

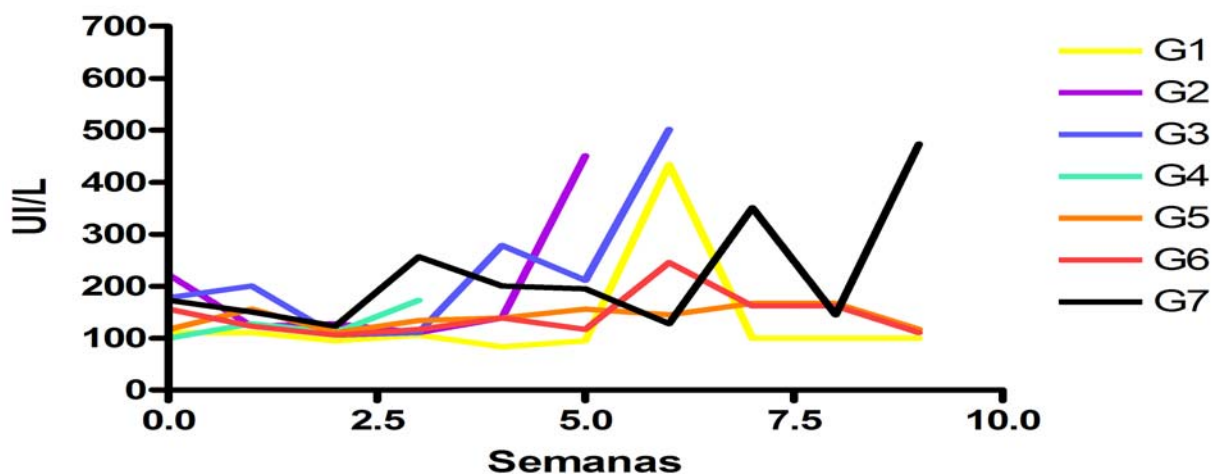


Figura 7. Níveis de AST individual dos ovinos do grupo G, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com 90 dias de crescimento - Brasília, 2007.

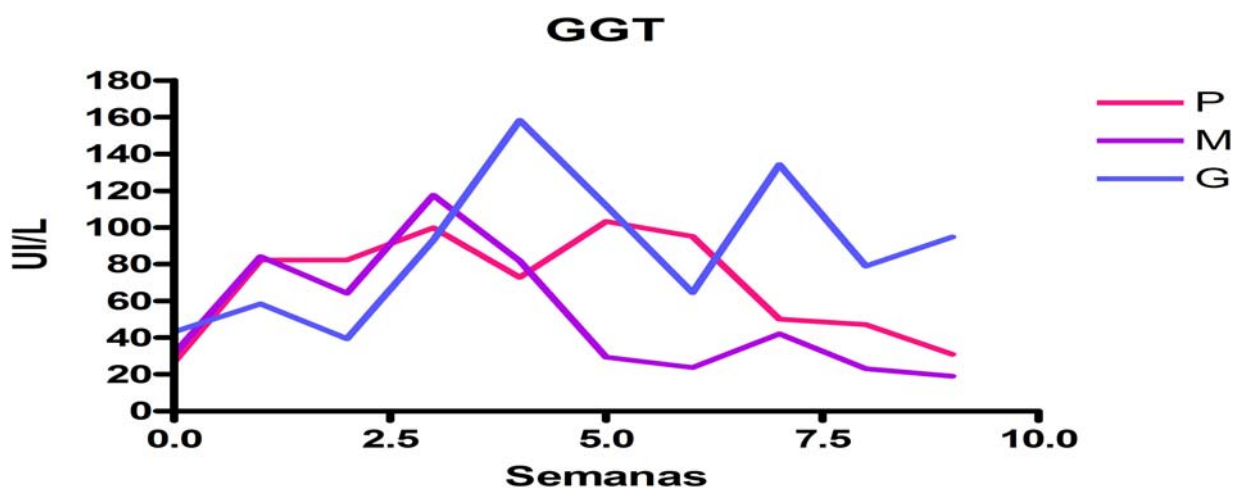


Figura 8. Níveis médios de GGT de ovinos do grupo P, grupo M e grupo G, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com 15, 45 e 90 dias de crescimento respectivamente - Brasília, 2007.

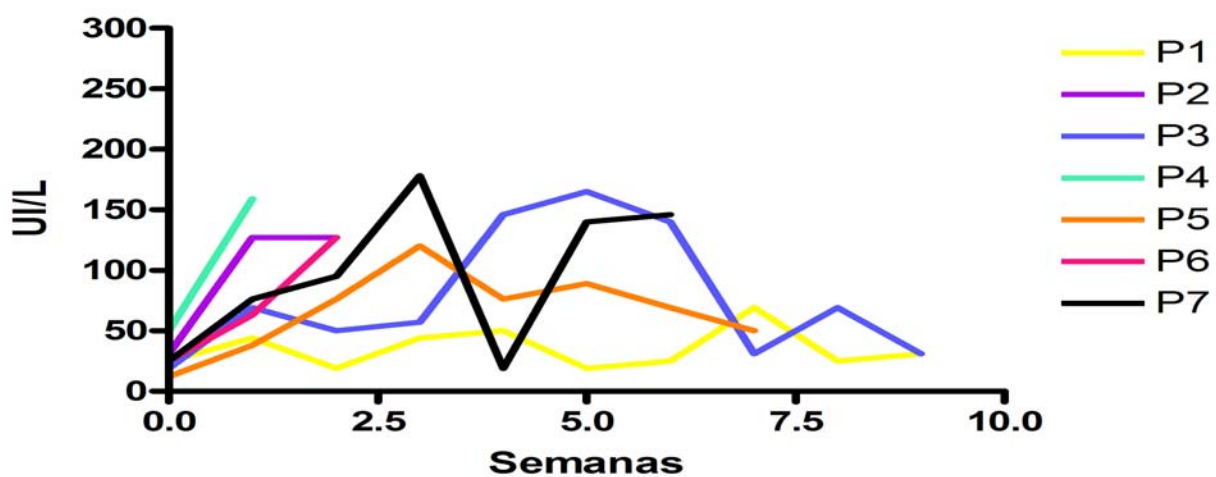


Figura 9. Níveis de GGT individual dos ovinos do grupo P, mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com 15 dias de crescimento - Brasília, 2007.

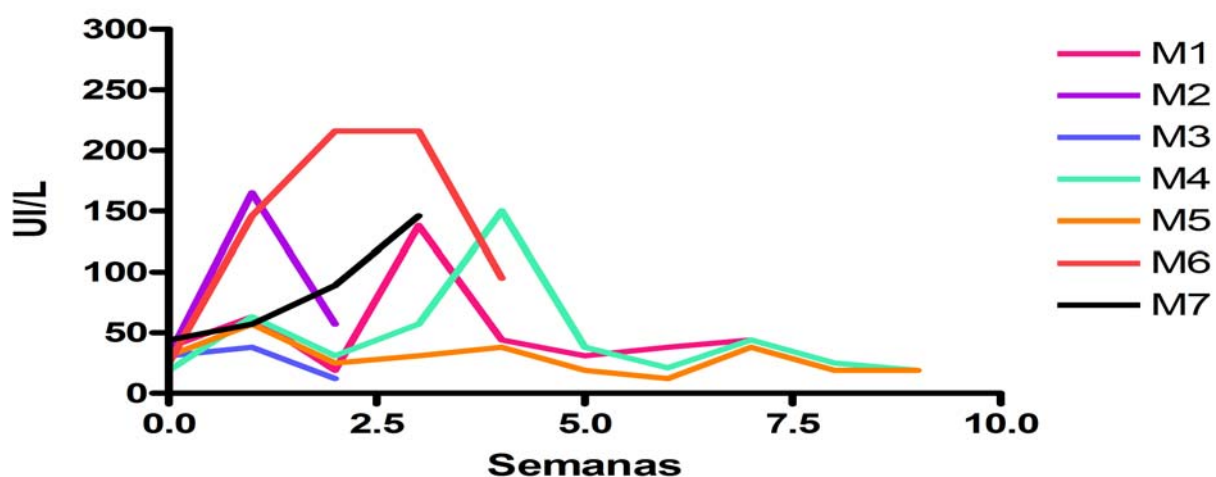


Figura 10. Níveis de GGT individual dos ovinos do grupo M, mantidos em *Brachiaria decumbens* com 45 dias de crescimento - Brasília, 2007.

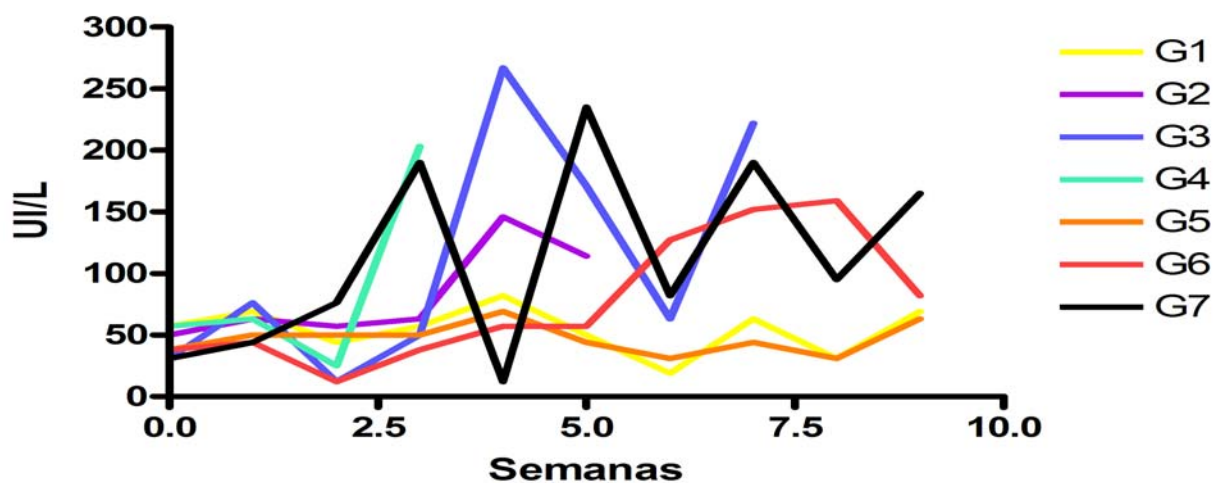


Figura 11. Níveis de GGT individual dos ovinos do grupo G, mantidos em *Brachiaria decumbens* com 90 dias de crescimento - Brasília, 2007.

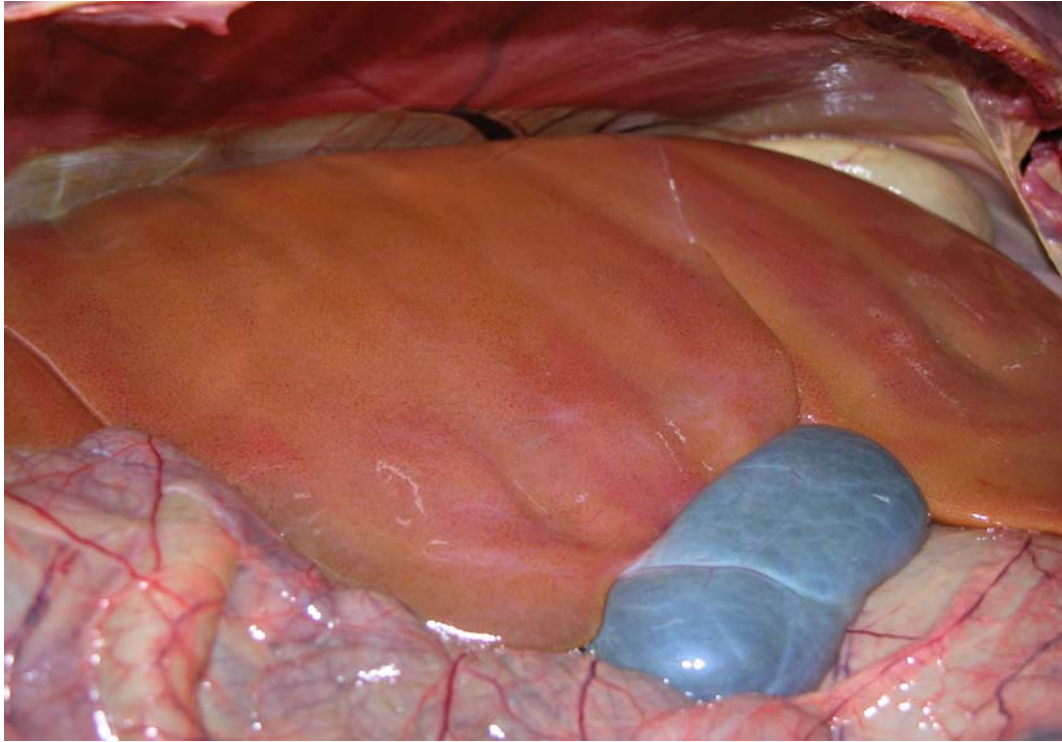


Figura 12. Ovino do grupo P. Intoxicação por *B. decubens*. Hepatomegala e distensão da vesícula biliar por acúmulo de bile. Observar a coloração amarelada e impressão das costelas na superfície do órgão - Brasília, 2007.

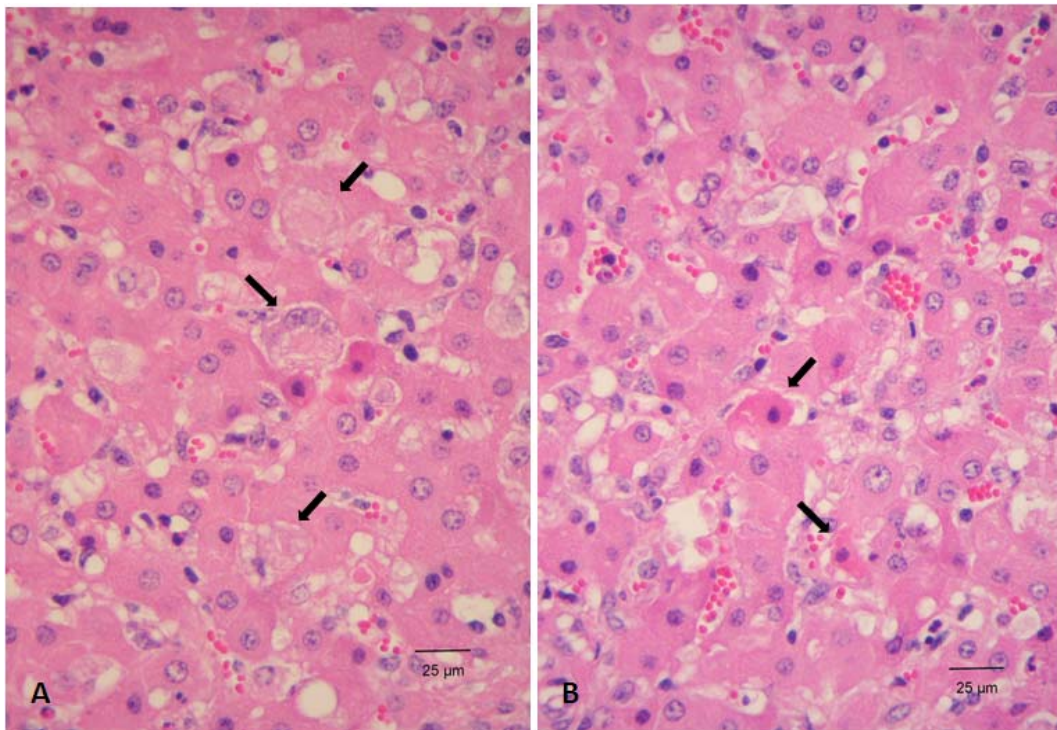


Figura 13. Fígado: A (animal do grupo P)- Macrófagos com citoplasma espumoso na luz de sinusóides (setas), alguns com imagens negativas de cristais aciculares, em ovino intoxicado (HE). B (animal do grupo P) - Necrose individual de hepatócitos (setas) em animal que morreu intoxicado por *B. decumbens* (HE) - Brasília, 2007.

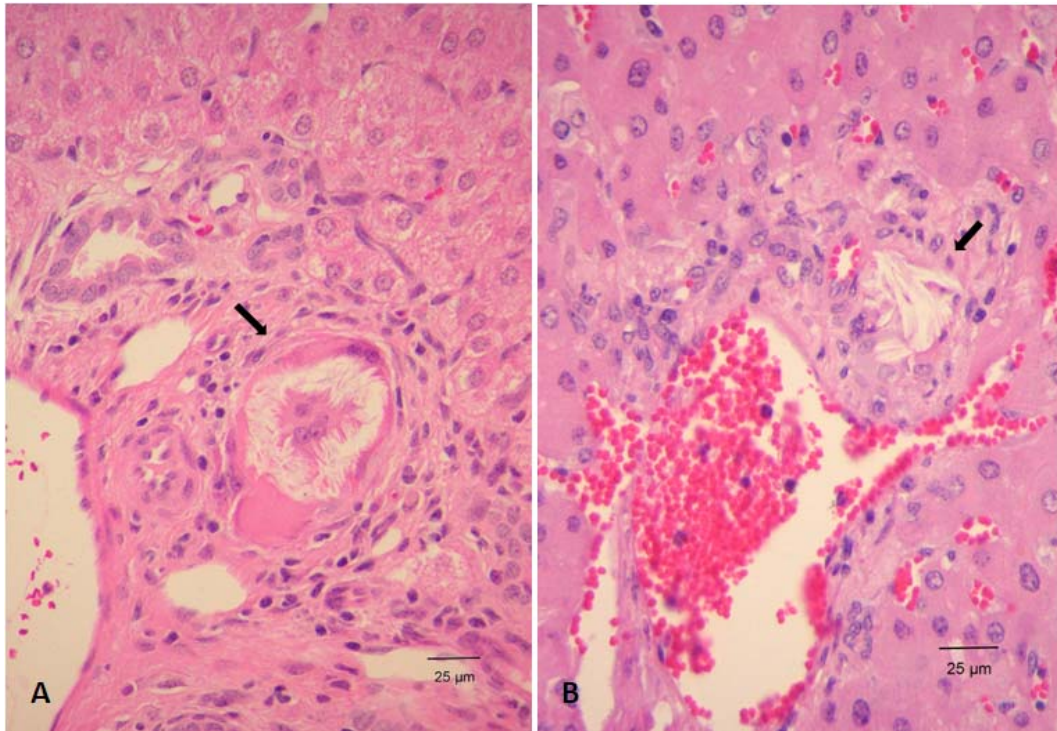


Figura 14A (animal do grupo P) e B (animal do grupo M). Fígado: Presença de cristais na luz de ductos biliares (seta), ectasia, necrose do epitélio do ducto e discreto infiltrado mononuclear periductal em ovinos intoxicados (HE) - Brasília, 2007.

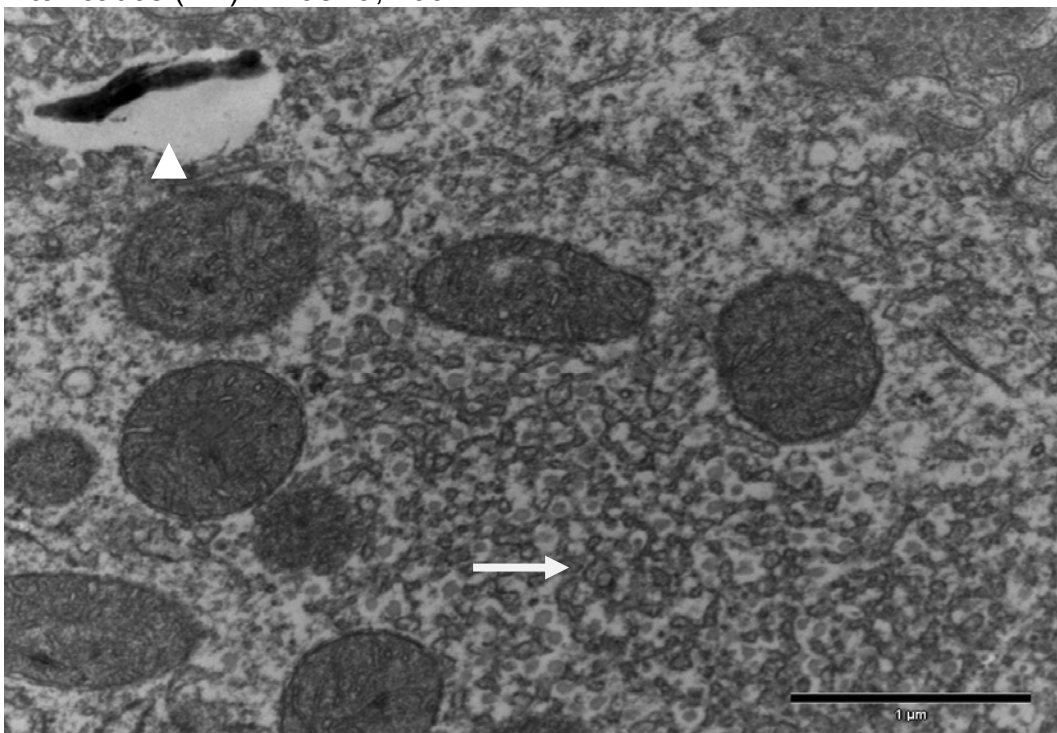


Figura 15. Fotomicrografia eletrônica do fígado de um ovino do grupo P, intoxicado pela *B. decumbens* mostrando hiperplasia de retículo endoplasmático liso (seta) e a imagem de um cristal de saponina (cabeça de seta) em hepatócito - Brasília, 2007.

Tabela 5. Concentração de protodioscina (%) na matéria seca nas amostras das pastagens do piquete P, M e G durante o experimento - Brasília, 2007.

Dias	P	M	G
18/3/2007	1,85	1,97	1,5
05/4/2007	1,90	2,21	1,91
19/4/2007	2,00	1,27	0,94
03/5/2007	2,05	1,53	1,19
17/5/2007	2,37	1,20	0,77
Média e DP	2,03±0,20 ^a	1,63±0,44 ^a	1,26±0,45 ^b

Médias com letras diferentes diferem entre si ($p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

Os ovinos deste experimento apresentaram 4 formas da intoxicação: hiperaguda, aguda, crônica e subclínica. Dentre estas, destaca-se a forma hiperaguda da intoxicação, caracterizada pelo aparecimento abrupto dos sinais clínicos e das lesões, seguida de morte. Esta forma clínica ainda não havia sido previamente descrita em ruminantes intoxicados pela *Brachiaria spp.* (ABDULLAH et al., 1989; DRIEMEIER et al., 1998; LEMOS et al., 1998).

A intoxicação pela *Brachiaria spp.* tem sido dividida em forma aguda, crônica moderada, crônica grave e subclínica (FAGLIARI et al., 1993; FIORAVANTE, 1999; GÓRNIK, 2008). Na forma aguda os animais apresentam lesões de pele e não apresentam icterícia. Na forma crônica moderada os animais se recuperam entre 8 e 30 dias após o início dos sinais clínicos, enquanto que na forma crônica grave, a icterícia é evidente três semanas após o aparecimento das lesões de pele. A forma subclínica, pode ter prevalência de até 64% no rebanho e caracteriza-se pela ausência de sinais clínicos (FIORAVANTE, 1999).

A forma aguda observada neste experimento (6/21) caracterizou-se pelo aparecimento abrupto dos sinais e morte logo após. Possivelmente, estes ovinos possuíam elevada susceptibilidade a intoxicação por *Brachiaria spp.* Isto poderia ser explicado pelo fato de serem animais que nunca tiveram contato com aquela forrageira, além de estarem na idade considerada mais susceptível (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007).

Neste experimento a forma crônica não foi dividida em moderada e grave. Os animais que apresentaram esta forma (3/11) demonstraram perda de peso progressiva, hiperemia de mucosa e aumento das enzimas séricas AST e GGT sem, no entanto apresentar icterícia. Vale ressaltar, que os animais deste experimento e que apresentaram a forma crônica, foram observados por apenas 2 meses, não sendo possível inferir sobre as conseqüências da exposição ainda mais prolongada no decurso da doença. Riet-Correa et al. (2002) e Ecco et al. (2004) caracterizaram a forma crônica pelo emagrecimento progressivo em animais que ingerem a planta durante longos períodos.

Os ovinos que apresentaram perda de peso (10/21) demonstraram lesões hepáticas difusas e elevação séricas das enzimas AST e GGT, que possivelmente sejam a causa do menor rendimento destes animais. A perda de peso dos animais intoxicados pode estar relacionada com as alterações no metabolismo do hepatócito e associada à baixa ingestão de alimentos (DRIEMEIER et al., 1999).

O aumento da sensibilidade cutânea exposta à radiação solar, decorrente a disfunção na excreção da filoeitrina, é descrita como a causa principal do edema de face e orelha (TOKARNIA, 2000). Após a deposição da filoeitrina e conseqüente aumento da sensibilidade da pele a radiação solar, ocorre extravasamento de enzimas lisossômicas para o tecido intersticial e lesão tecidual. A histamina liberada pelos mastócitos no local da lesão aumenta a permeabilidade vascular levando ao edema (YAGER; SCOTT, 1993). Possivelmente, esta possa ser a causa das alterações observadas principalmente nos animais intoxicados na forma hiperaguda (3/21) no presente experimento. Porém, devido às características únicas de distribuição destas manifestações clínicas, não é possível concluir quanto a sua real patogênese (LEMOS et al., 2002). O edema de face e orelha, assim como o eczema facial, vem sendo descritos caracteristicamente e exclusivamente em ovinos intoxicados pela forrageira (SALLAN ABDULLA et al., 1992).

Apesar das formas clínicas descritas, não há um consenso, por alguns autores, se a intoxicação pela *Brachiaria* spp. é decorrente das saponinas litogênicas presentes na planta ou pela esporidesmina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum* (FAGLIARI et al., 1993; FIORAVANTE, 1999; GÓRNIK, 2008).

A queda de pêlo, erosões e ulcerações cutâneas observadas em um único animal do grupo P, são características da fotossensibilização hepatógena, por retenção hepática da filoeitrina (STEGELMEIER, 2002; PIMENTEL et al., 2007). É importante lembrar que lesões de pele não foram observadas em nenhum outro ovino deste experimento. A maioria dos animais utilizados era de pelagem negra e da raça Santa Inês e isto talvez explique a baixa incidência das alterações cutâneas. Mas também se deve ressaltar, que vários animais adoeceram rapidamente e muitos morreram, podendo assim ter contribuído para o não surgimento das lesões. Estas observações foram constatadas em um ovino com manchas brancas na pelagem, que apresentou severa fotossensibilização nestas áreas, somente depois de retirado

da pastagem para que evitar a morte. O acúmulo da filioeritrina é freqüentemente descrito em casos de intoxicação por plantas hepatotóxicas que contenham saponinas, sendo atribuída a obstrução dos ductos biliares por material cristalóide (KELLERMEN et al., 1988; DRIEMEIER et al., 2002) ou a lesão hepatocelular (FLAOYEN et al., 1991).

Alguns ovinos intoxicados pela forrageira apresentaram hiperemia da mucosa ocular, fotofobia e aumento da secreção ocular, porém, seus mecanismos ainda não foram elucidados (TOKARNIA, 2000; LEMOS et al., 2002). Possivelmente estes sinais estejam relacionado ao aumento da sensibilidade local a radiação solar por deposição da filioeritrina.

A maior elevação dos níveis séricos de AST no grupo P e M ocorreu na segunda semana enquanto que no grupo G houve uma elevação gradual com o pico máximo na sétima semana. A enzima AST é encontrada no citoplasma e mitocôndria de hepatócitos, células musculares estriadas esqueléticas e estriadas cardíacas. Em lesões hepáticas agudas ou crônicas, os níveis desta enzima tendem a se elevar na circulação (TENNANT, 1997).

No grupo P e M a maior elevação de GGT ocorreu na segunda semana enquanto que no grupo G ocorreu na quarta semana. A gama-glutamyltransferase está presente na membrana plasmática de células do epitélio dos ductos biliares e seus níveis elevados na circulação são observados em lesões hepáticas, de ductos biliares, mas principalmente, nas colestases (TENNANT, 1997). Vários animais intoxicados (6/12) neste experimento apresentaram icterícia, o que justificaria o aumento sérico da enzima GGT devido a colestase.

As elevações mais precoces de AST e GGT no grupo P e M, coincidem com a maior rapidez que os ovinos adoeceram e morreram. É importante considerar que os diferentes grupos de ovinos eram homogêneos, da mesma procedência e com a idade semelhante. Por esta razão, as evidências sugerem fortemente que as alterações enzimáticas nos grupos P e M foram decorrentes a maior toxicidade destas pastagens em relação ao grupo G. No entanto, a elevação destas enzimas nem sempre se refletiram em sinais clínicos da intoxicação. Considera-se, entretanto, que animais com sinais clínicos da intoxicação pela forrageira, geralmente demonstram elevação sérica das enzimas AST e GGT (HANSEN et al., 1994 e BARBOSA et al., 2006).

Alguns animais classificados com a forma subclínica da intoxicação (9/21), mesmo não apresentando alterações clínicas durante o período experimental, exibiram elevações expressivas enzimáticas. Possivelmente, isto se deva a diferenças individuais na susceptibilidade dos animais à intoxicação (CASTRO et al., 2007). Deve-se ressaltar que mesmo aumentos consideráveis de AST e GGT não puderam ser correlacionados diretamente com o diagnóstico e prognóstico da intoxicação. Ovinos sem sinais clínicos apresentaram as maiores elevações destas enzimas, superando inclusive os animais que morreram da intoxicação. É relevante, que os animais que se intoxicaram precocemente, apresentaram um rápido pico de AST, podendo estar relacionado à morte dos mesmos. Os ovinos que sobreviveram, ou não manifestaram sinais clínicos, apresentaram elevação de AST mais gradativa e duradoura, mesmo atingindo as maiores magnitudes. Estas observações permitem inferir que os animais mais resistentes a intoxicação, também sofrem a ação hepatotóxica da gramínea, porém são melhores capacitados a lidar com a toxina. Estes mesmos animais, nas últimas semanas do experimento, demonstraram redução gradativa de AST e GGT, sugerindo menor lesão hepática e uma possível adaptação dos mesmos aos níveis tóxicos de saponina nas pastagens.

Os ovinos dos três piquetes se intoxicaram durante o período experimental (5 animais do grupo P, 4 animais do grupo M e 3 animais do grupo G), demonstrando a toxicidade da planta em qualquer época do crescimento vegetativo. Mas deve-se ressaltar que os níveis de protodioscina estavam significativamente maiores na pastagem P (brotação), coincidindo com o surgimento dos sinais clínicos mais severos nos animais, além da maior taxa de morbidade (71,43%) e de mortalidade (44,44%). Os achados clínico-patológicos deste experimento permitem inclusive inferir, que os níveis de protodioscina nas pastagens tiveram uma relação direta com a velocidade que os animais demoraram a se intoxicar, na taxa de morbidade e também na mortalidade. Em outro experimento com ovinos foram descritas concentrações maiores de protodioscina na *B. decumbens* na fase final do ciclo vegetativo, em processo de sementação (BRUM et al., 2007). No entanto, deve-se considerar que a metodologia analítica para detectar os níveis de saponinas na gramínea naquele experimento, foi menos sensível e precisa à utilizada nas amostras atuais. A amostragem daquelas pastagens também pode ter variado e influenciado nos resultados. Isto talvez explique às discrepâncias entre as

observações. Uma maior toxicidade da planta, em casos naturais, vem sendo relatada após queimadas ou secas prolongadas, quando então a forrageira encontra-se em brotação (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007). Esta afirmação corrobora com os achados deste experimento, em que a maior toxicidade e quantidade de protodioscina foi encontrada nas amostras de capim do piquete P, com apenas 15 dias de crescimento.

Supõe-se que, para que haja a intoxicação por braquiária em ovinos, não é necessária grande quantidade da toxina, pois esta espécie é considerada altamente sensível (BRUM, 2006). Há fortes indícios que isto realmente ocorra, uma vez que os animais do grupo G, pastejando o capim com um crescimento mínimo de 90 dias (forrageira madura), também adoeceram e morreram. As amostras daquele piquete apresentaram os menores níveis de protodioscina dos três.

O rebanho ovino do Distrito Federal é formado, em sua maioria, por animais importados da região Nordeste, e que nunca tiveram contato com a gramínea. Possivelmente, esta seja a causa da elevada sensibilidade dos ovinos ao se intoxicarem em pastagens de braquiária, assim como a elevada mortalidade observada neste experimento.

Um fato notório e relevante na pecuária nacional, é que as pastagens de braquiária, ao serem introduzidas no País, provocaram o surgimento de inúmeros casos de intoxicação em bovinos naquela época (ANDRADE et al., 1975; 1978). É bem conhecido que animais introduzidos pela primeira vez em pastagens de braquiária são mais susceptíveis a intoxicarem-se, cuja explicação ainda é desconhecida (RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007). Os bovinos também são considerados naturalmente mais resistentes a intoxicação (KHAIRI et al., 2000). Atualmente, a maior parte do rebanho bovino no Brasil está assentado, por longos períodos, em áreas com amplo domínio daquela forrageira. Talvez alguma forma de adaptação tenha ocorrido naquela espécie, contribuindo sensivelmente para uma redução das perdas decorrentes a intoxicação naquelas pastagens, em comparação ao início de sua utilização no País. Isto pode ser comprovado quando foram observadas diferenças na susceptibilidade entre animais procedentes de plantéis criados há vários anos em pastagens da gramínea com aqueles que jamais tiveram contato com a forrageira (CASTRO et al., 2007)

Apesar disto, como no Brasil mais de 50% das pastagens cultivadas são de braquiária, a gramínea vem sendo recomendada como uma boa opção à ovinocultura (VIANA; BORGES, 2006a e b). Em outros estados, como Mato Grosso do Sul (LEMOS, 2007. Comunicação pessoal) e São Paulo (CASTRO, 2008. Comunicação pessoal), há vários anos ocorre a criação de ovinos de outras raças e procedências em pastagens de braquiária, havendo perdas de menor importância decorrentes à intoxicação pela planta. Por esta razão, o fator racial também deve ser considerado, pois a maioria dos ovinos deste experimento eram mestiços Santa Inês. Até o momento não se conhece diferenças na susceptibilidade das raças ovinas à intoxicação por *Brachiaria* spp.

Nos animais necropsiados (9/21), o achado mais importante foi a hepatomegalia, porém não foi observada em todos os animais a coloração amarela-cobreada no fígado, geralmente descrita em casos crônicos da intoxicação (LEMOS et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2002). Esta coloração foi raramente visualizada nos animais do experimento, e possivelmente devido à relativa curta duração do período experimental (8 semanas) ou devido à recuperação dos ovinos que apresentaram a forma clínica crônica.

Não foram visualizadas nos animais necropsiados alterações macroscópicas em linfonodos hepáticos e mesentéricos, provavelmente devido ao fato da maioria dos animais apresentarem intoxicação hiperaguda ou aguda. Em bovinos foi descrita a ocorrência de estriações esbranquiçadas na superfície de corte dos linfonodos hepáticos e mesentéricos, dispostas de forma radiada, da cortical em direção a medular, nos animais intoxicados (DRIEMEIER et al., 1998). Estas alterações não foram constatadas no presente experimento, mas pode-se especular que não tenham ocorrido devido a curta duração da intoxicação ou por diferenças entre as espécies.

Na microscopia óptica, além da tumefação e vacuolização dos hepatócitos (18/21), foram visualizadas imagens negativas de cristais aculiformes em seu citoplasma. Os cristais também foram visualizados no interior de macrófagos com citoplasma de aspecto espumoso, dispostos pelo parênquima hepático, mas em maior quantidade, próximos a grandes ductos biliares.

Cristais também foram encontrados na luz de canalículos biliares (um animal do grupo P e um animal do grupo M). Estes ovinos apresentaram a forma

hiperaguda da intoxicação com icterícia bastante acentuada da carcaça, comprovada microscopicamente pela colestase bastante intensa. Cristais depositados na luz de canalículos biliares são considerados a causa de obstrução mecânica do fluxo biliar e colestase em bovinos intoxicados por braquiária (BUTTON et al., 1987; FLAOYEN et al., 1991; SANTOS et al., 2008). Considera-se que estes cristais se formem pela conjugação das saponinas esteroidais epismilagenina e episarsasapogenina com o ácido glicurônico. O resultado desta conjugação são os glicuronídeos, que ao se unirem às moléculas de cálcio, formam os característicos cristais (LAJIS et al., 1993; CRUZ et al., 2000; 2001). Em outros países, os típicos cristais também são encontrados no fígado dos animais intoxicados por outras plantas, que apresentam em sua constituição diferentes composições de saponinas esteroidais litogênicas, como *Nartheccium ossifragum* e *Panicum dichotomiflorum* (MEAGHER et al., 1996; WISLOFF et al., 2002). É importante ressaltar que a presença de material cristalóide no interior dos ductos biliares não foi detectada em todos os ovinos ictericos intoxicados por braquiária. Isto sugere que a icterícia ocorra não somente devido à colestase, mas também por lesão direta ao hepatócito. Foi sugerido que o hepatócito é o alvo inicial da ação tóxica da braquiária em ovinos, e dependendo da severidade, poderia causar subsequente colangiopatia e fotossensibilização (DRIEMEIER et al., 2002).

Macrófagos com citoplasma espumoso, e com cristais em seu citoplasma, também foram visualizados em linfonodos hepáticos (3/21) em animais que tiveram a forma hiperaguda (dois animais do grupo P e um animal do grupo M). Esta forma de linfadenite granulomatosa, com presença de macrófagos espumosos, é descrita principalmente em linfonodos hepáticos e mesentéricos de bovinos mantidos em pastagens de braquiária (DRIEMEIER et al., 1998; LEMOS et al., 2002).

Necrose individual de hepatócitos, com pequenos de aglomerados de neutrófilos, foi observada no fígado somente de animais que se intoxicaram na forma hiperaguda. A necrose e degeneração de hepatócitos periportais podem ocorrer na intoxicação pela *Brachiaria* spp. (SANTOS et al., 2008). Não são descritos os mecanismos da patogênese da necrose individual de hepatócitos e da presença de neutrófilos pelo parênquima hepático (ALESSI et al., 1994). O fato de se encontrar estas alterações, apenas nos animais com a manifestação hiperaguda da doença, sugere uma maior severidade das lesões comprovada pela morte de todos estes

animais. Os pequenos aglomerados de neutrófilos no parênquima hepático provavelmente surjam em decorrência da necrose dos hepatócitos.

A fibroplasia periportal foi observada apenas em animais que se intoxicaram após um mês do experimento (forma crônica) além de discreto infiltrado linfohistiocitário adjacente. Considera-se que a deposição de tecido fibroso periportal é um achado freqüente em animais intoxicados pela *Brachiaria* spp. (LEMOS et al., 1998; CRUZ et al., 2000). Os mecanismos de proliferação de fibroblastos e deposição de tecido fibroso poderiam estar associados à presença local de macrófagos e linfócitos periportais. Estas células são capazes de liberar fatores que estimulam a fibroplasia, com a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno (PEREIRA, 2004b).

Em relação à degeneração de células epiteliais de túbulos renais, observada em animais deste experimento, não se conhece a causa exata desta alteração morfológica (ECCO et al., 2004; RIET-CORREA; MÉNDEZ, 2007). No entanto, ovinos mantidos em pastagens de *B. decumbens*, apresentam redução dos níveis de enzimas, ainda não determinadas, responsáveis pela metabolização de drogas no tecido renal (KHAIRI et al., 2000). Talvez isto possa estar relacionado às alterações nas células tubulares renais encontradas na intoxicação pela planta.

Na microscopia eletrônica dos fragmentos hepáticos, observou-se hiperplasia de retículo endoplasmático liso e numerosos cristais no citoplasma de hepatócitos (Figura 9) e ductos biliares (um animal do grupo M). Estes achados ultraestruturais já haviam sido previamente descritos em bovinos (DRIEMEIER et al., 1998; TORRES; COELHO, 2003) e ovinos (DRIEMEIER et al., 2002). Até o momento não foi descrito o mecanismo pelo qual ocorre a hiperplasia do retículo endoplasmático liso na intoxicação pela *Brachiaria* spp. (SANTOS et al., 2008). Entretanto, é bem conhecida este tipo de alteração nos hepatócitos, induzida pela administração de drogas como fenobarbitona e griseofulvina (KAIRI et al., 2000; HAISAH et al., 2003).

O fígado é o principal órgão de biotransformação dos xenobióticos. A mesma ocorre no retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos sendo dividida em duas fases. As reações de fase I são responsáveis pela conversão de substâncias químicas apolares em polares pela oxidação, redução ou hidrólise. Na reação de fase II formam-se complexos de metabólitos originados da primeira fase com

compostos endógenos como o ácido glicurônico tornando-se solúveis de fácil excreção (PEREIRA, 2004a).

A microscopia eletrônica (ME) revelou que a tumefação dos hepatócitos, que inicialmente fora interpretada como degeneração hidrópica, na verdade, era devido a marcante hiperplasia do REL. Surpreendentemente, isto conferiu o aspecto tumefeito dos hepatócitos que não apresentavam nenhuma alteração compatível com edema celular na ME. Estas alterações ultraestruturais foram observadas tanto em animais severamente intoxicados e que morreram, como em ovinos que chegaram até o final do experimento sem manifestarem sinais clínicos, somente elevação de AST e GGT. Isto demonstra que esta alteração no REL não necessariamente está associada a resistência ou sobrevivência dos ovinos à intoxicação.

Foi demonstrado que ovinos alimentados com pastagem de *B. decumbens* apresentam uma redução da citocromo P-450 e de outras enzimas microssomais no fígado e rins, por mecanismos não conhecidos, diminuindo a capacidade geral dos órgãos de metabolizarem e detoxificarem substâncias (KHAIRI et al., 2000). O sistema citocromo P450 é mediado por monoxigenases associadas ao NADPH e oxigênio molecular, realizando a oxidação e metabolização de diversas substâncias químicas (OLIVEIRA et al., 2006). Localiza-se principalmente na membrana do REL de hepatócitos e em menor concentração em enterócitos, epitélio brônquico e células renais (COOPER, 1997; PEREIRA, 2004a).

Parece um contra-censo haver uma redução da citocromo P-450 e de outras enzimas microssomais, ao mesmo tempo em que há marcante hiperplasia do REL observada neste experimento, e em ovinos de outros estudos (DRIEMEIER et al. 2002) e também em bovinos (DRIEMEIER et al. 1998; TORRES; COELHO, 2003). Entretanto, foi demonstrado que ovinos ao receberem fenobarbitona via oral, demoraram mais para se intoxicarem e apresentaram sinais clínicos muito menos severos que aqueles que não receberam a droga (KHAIRI et al., 2000). Estas observações sugerem a importância do REL e seu sistema enzimático na detoxificação das saponinas esteroidais presentes nas pastagens de braquiária.

A fenobarbitona é um conhecido e potente indutor da citocromo P-450, aumentando em até 90 vezes sua atividade quando administrada por longos períodos e promovendo também marcante hiperplasia do REL. É notório, que a indução da citocromo P-450, como acontece com a administração de fenobarbitona,

é capaz de inespecificamente influenciar a metabolização de diversas substâncias (STROMBECK; GUILFORD, 1991; HASIAH et al., 2000).

A natureza esteroideal das saponinas presentes nas pastagens de braquiária, possivelmente explique as alterações encontradas na ME em hepatócitos, especialmente a hiperplasia do REL. Algumas saponinas, como aquelas encontradas nas braquiárias, possuem uma porção hidrofílica (glicosídeo) e outra lipofílica (esteróide) sendo geralmente bastante hidrossolúveis (MAHATO et al., 1982; HARAGUSHI; GÓRNIK, 2008). Substâncias lipídicas e esteroideais são em sua maioria metabolizadas no REL pelo sistema citocromo P-450 (STROMBECK; GUILFORD, 1991; FLORIO; SOUSA, 2008).

Diferenças entre as concentrações de enzimas responsáveis pela biotransformação de substâncias foram detectadas no fígado de ovinos e bovinos. (KHAIRI et al., 2000). Bovinos apresentaram uma redução maior dos níveis de enzimas responsáveis pela fase I e II da biotransformação hepática, ao se alimentarem em pastagens de *B. decumbens*, quando comparados aos ovinos. Estas observações sugerem que há outros fatores desconhecidos envolvidos além da biotransformação, na maior resistência dos bovinos a intoxicação pela planta (KHAIRI et al., 2000). Isto é reforçado quando foi administrada griseofulvina a ovinos, que induziu o aumento na concentração de enzimas hepáticas responsáveis pela fase I e II da biotransformação, mas também não foi capaz de proteger os animais da intoxicação pela braquiária (HAISAH et al. 2003).

O presente experimento demonstrou a severidade da intoxicação por *B. decumbens* para ovinos não adaptados àquela forrageira. Ficou claro pelas lesões encontradas nos animais e pela quase ausência de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* naquelas pastagens, que as manifestações clínico-patológicas estavam definitivamente associadas aos níveis tóxicos de saponina (protodioscina) em todos os piquetes.

CONCLUSÕES

- Pastagens de *B. decumbens* em brotação são mais tóxicas para ovinos e apresentaram os maiores níveis de saponinas esteroidais litogênicas em sua constituição;
- Todas as pastagens neste experimento foram tóxicas aos ovinos mesmo existindo diferenças consideráveis dos níveis de protodioscina entre elas;
- Alguns ovinos apresentaram uma forma hiperaguda da doença, diferentemente das formas clínicas descritas em ruminantes até o momento;
- Animais intoxicados, com ou sem sinais clínicos da intoxicação, quando mantidos em pastagens de *B. decumbens*, apresentaram hiperplasia do REL;
- Os níveis séricos de AST e GGT não foram capazes de demonstrar a severidade da intoxicação e nem puderam ser associadas ao surgimento dos sinais clínicos;

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A.S.; NOORDIN, M.M.; RAJION, M.A. Neurological disorders in sheep during signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.31, p.128-9, 1989.

ALESSI, A.C.; FAGLIARI, J.J.; OKUDA, H.T. E PASSIPIERI, M. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. 4. Lesões hepáticas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.46, p. 319-328, 1994.

ALVARIZA, F. R. Intoxicação por *Pithomyces chartarum*. In: Riet-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. D. C.; SCHILD, A. L. Intoxicação por plantas e micotoxinas em animais domésticos. Hemisfério Sul do Brasil: Pelotas. 1993, p.93-101.

AMORIM, R.M.; BORGES, A.S.; KUCHEMUCK, G.; TAKAHIRA, R.K.; ALENCAR, N.X. Bioquímica sérica e hemograma de bovinos antes e após a técnica de biópsia hepática. *Ciência rural*, v. 33, p.519-523, 2003.

ANDRADE, S. A.; NOTHENBERG, M.S.; RETZ, L.; BUENO, P.C. Estudo sobre cobaias alimentadas com *Brachiaria* sp. (Tanner Grass). **Biol.** v.42, p. 243-246, 1975.

ANDRADE, S.O.; SILVA LOPES, H.O.; BARROS, M.A.; LEITE, G.G.; DIAS, S.M.C.; SAUERESSIG, M; NOBRE, D.; TEMPERINI, J.A. Aspectos da fotossensibilização em bovinos em pastagens de *Brachiaria decumbens* Stapf infestadas por *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M.B. Ellis. **Arq. Inst. Biol.**, v. 45, p.117-136, 1978.

BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, p.147-153, 2006.

BRUM, K. B. Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistemas de pastejo. Goiânia, UFG: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2006. 93p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária.

BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS R.A.A.; RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M.C.S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, p.39-42, 2007.

BUTTON, C.; PAYNTER, D.I.; SHIEL, M.J.; COLSON, A.R.; PATERSON, P.J.; LYFORD, R.L. Crystal-associated cholangiopatopathy and photosensitisation in lambs. **Aust. Vet. J.**, v.64, p.176-180, 1987.

CASTRO, M.B. - comunicação pessoal - Lab. Patol. Vet. - Universidade de Brasília, DF, 2008.

CASTRO, M.B.; MOSCARDINI, A.R.C; RECKZIEGEL, G. C.; NOVAES, E. P. F.; MUSTAFA, V. S.; PALUDO, G.R.; BORGES, J.R.J; RIET-CORREA, F. Susceptibilidade de ovinos a intoxicação por *Brachiaria decumbens*.. In: V Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, 2007.

COOPER, G.M. **The Cell, A Molecular approach**. ASM Press: Washington, D.C., 1997, 673p.

CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V.S.; COLODEL, E.M.; TAKETA, A.T.C. & SCHENKEL, E.P. Isolation of steroidal saponinogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens*. **Vet. Diag. Invest.**, v.42, p.142-145, 2000.

CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V.S.; SCHENKEL, E.P. Experimentally induced cholangiohepatopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.13, p.170-172, 2001.

DIMENNA, M.E.; BAILEY, J.R. Pithomyces chartarum spore counts in pasture. J. of Agri. Resear., v.16, p.343-351, 1973.

DRIEMEIER D.; BARROS S.S.; PEIXOTO P.V.; TOKARNIA C.H.; DÖBEREINER J. BRITO M.F. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, p.29-34.1998.

DRIEMEIER D.; COLODEL E.M.; SEITZ A.L.; BARROS S.S.; CRUZ C.E.F. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. **Toxicon**, v.40, p.1027-1031, 2002.

DRIEMEIER; D., DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.19, p.79-83, 1999.

ECCO, R.; SANTOS JR, H.L.; TÚRY, E. & JACOBINA, G.C. Intoxicação crônica por *Brachiaria* spp. em Bovinos. 2004. **Pesq. Vet. Bra.**, 24(supl.):19-20.

FAGLIARI, J.J.; PASSIPIERI, M.; KUCHEMUCK, M.R.G. E CURI, P.R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporodesmina. II. Aspectos clínicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.45, p. 275-282, 1993.

FIORAVANTE, M.C.S. Incidência, avaliações clínicas, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporodesmina em bovinos. 1999. 256f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista, Botucatu.

FLAOYEN, A.; BORREBAE, B. AND NORDSTOGA, K. Glycogen accumulation and histological changes in the livers of lambs with alveld and experimental sporidesmin intoxication. **Vet Res Com.**, v. 15, p.443-453, 1991.

FLÓRIO, J.C.; SOUSA, A.B..Toxicocinética e toxicodinâmica. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada a Medicina Veterinária**. 1ed. São Paulo: Manole. 2008. p.15-39.

GJULEMETOWA R.; TOMOWA M.; SIMOWA M.; PANGAROWA T. & PEEWA S. Über die bestimmung von furostanolsaponinen im präparat tribestan®. **Pharmazie**, v.37, p.296, 1982.

GOMAR, M.S.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; GIMENO, E.J. Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* spp. **J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.52, p.18-21, 2005.

GÓRNIAC, S.L. Plantas Tóxicas de Interesse Agropecuário. In: SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. 1ed. São Paulo: Manole. 2008. v.1, cap. 15, p.415-458.

GRAYDON R.I., HAMID H., ZAHARI P. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. **Aust. Vet. J.**, v. 68, p.234-236, 1991.

HAISAH, A.H.; ELSHEIKH, H.A.; KHAIRI, H.M.; ABDULLAH, A.S. Effect of Griseofulvin on the Toxicity of Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) in Sheep. **Vet. Humam. Toxicol.** v.45, p.68-71, 2003.

HANSEN, D.E.; MCCOY, R.D.; HEDSTROM, O.R.; SNYDER, S.P.; BALLERSTEDT, P.B. Photosensitization associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. **J. of the Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.204, p.1668-1671, 1994.

HARAGUCHI, M.; GÓRNIAC, S.L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada a Medicina Veterinária**. 1ed. São Paulo: Manole. 2008. p. 367-414.

HASIAH, A.H.; ELSHEIKH, H.A.; ABDULLAH, A.S.; KHAIRI, H.M. AND RAJION, M.A. Effect of Phenobarbitone Treatment Against Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) Toxicity in Sheep. **The Vet. J.Vet...**, v.160, p. 267-272, 2000.

KELLERMAM T.S.; COETZER, J.A. & NAUDE, T.W. Liver hepatotoxicoses with photosensitivity. In: T.S. Kellermam, J.A. Coetzer and T.W. Naude. Plant Poisoning and Mycotoxicosis of Livestock in Southern Africa, Oxford University Press. Cape Town. p. 2-40. 1988.

KELLY, W.R. The Liver and Biliary System. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. v.2, 4 ed. Academic Press: California. 1993. 747p.

KHAIRI, H.M.; ELSHEIKH, H.A.; ABDULLAH, A.S. The Effect of Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) on Drug-Metabolizing Enzymes in Sheep and Comparison with Normal Cells. **Vet. Human Toxicol.**, v.42, p.193-195, 2000.

LAJIS, N.H.; ABDULLAH, A.S.; SALIM, S.J.; BREMNER, J.B.; KHAN, M.N. Epi-sarsasapogenin and epi-smilagenins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. **Steroids**. v.58, p.387-9, 1993.

LEMOS R.A.A.; PURISCO E. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena. In: LEMOS, R.A.A.; BARROS, N.; BRUM, K.B. **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: Perguntas e respostas**. Campo Grande:UFSM. 2002. 292p.

LEMOS R.A.A.; SALVADOR S.C.; NAKAZATO L. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.39, p. 376-377, 1997.

LEMOS, R.A.A.; FERREIRA, L.C.L.; SILVA, S.M.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, v.26, p.109-113, 1996.

LEMOS, R.A.A.; OLIVEIRA, V.A.; HERRERO, JR, G.O.; SILVEIRA, A.C.; PORFÍRIO, L.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. **Ciência rural**, v. 28, p.507-510, 1998.

MAHATO, S.B.; GANGULY, A.N. and SAHU, N.P. Steroid Saponins. **Phytochem.**, v.21, p. 959-978, 1982.

MEAGHER, L.P.; WILKINS, A.L.; MILES, C.O.; COLLIN, R.G.; FAGLIARI, J.J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Vet. Hum. Toxicol.** v.38, p.271-4, 1996.

OLIVEIRA, A.M.; COSTA, L.F.; FONSECA, C.A. Farmacogenética e farmacogenômica da biotransformação de drogas. **Revista eletrônica de farmácia.** v.3, p.39-41, 2006.

PEREIRA, F.E.L. Etiopatogênese Geral das Lesões. In: FILHO, G.B. Bogliolo, **Patologia Geral**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004a, 367p.

PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In: FILHO, G.B. Bogliolo, **Patologia Geral**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004b, 367p.

PIMENTEL, L.A.; RIET-CORREA, F.; GUEDES, K.M.R.; MACEDO, J.T.S.A.; MEDEIROS, R.M.T. E DANTAS, A.F.M. Fotossensibilização primária em eqüídeos e ruminantes no semi-árido causada por *Froelichia humboldtiana* (Amaranthaceae). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, p. 23-28, 2007.

RIET-CORREA F.; MEDEIROS R.M. Intoxicações por plantas no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle, e riscos para a Saúde Pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21 p.38-42, 2001.

RIET-CORREA, F. E MÉNDEZ, M.D.C. Intoxicações por Plantas e Micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. Santa Maria: Palotti. 3ed. v.2. 2007. 99-221p.

RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; DRIEMEIER, D. Wasting and Death in Cattle Associated with Chronic Grazing of *Brachiaria decumbens*. **Vet. Human. Toxicol.** v.44, p.179-180, 2002

SALAM ABDULLAH, A.; LAJIS, N.H.; BREMNER, J.B.; DAVIES, N.W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M.A. Decumbens intoxicated sheep. **Vet. and Human Toxicol.**, v.34 p.154-155, 1992.

SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V. e BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq.Vet. Bras.**, v.28, p.1-14, 2008.

SMITH, B.L.; MILES, C.O. A letter to the editor: a role for *Brachiaria decumbens* in hepatogenous **Photosensitization of Ruminantes? Veterinary and Human Toxicology**, v.35, p.256-257, 1993.

STEGELMEIER, B.L. Equine Photosensitization. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 2., 2002. 81-88p.

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. **Small Animal Gastroenterology**. 2ed. London: Wolfe Publishing Ltd. 1991, p.744

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed. London: Academic Press, 1997, p.327-352.

TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J & PEIXOTO P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Helianthus: Rio de Janeiro, 2000, 310 p.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M.F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, IBGE, Rio de Janeiro, 1979. 95p.

TORRES, M.B.A.M.; COELHO, K.L.R. Foamy Macrophages in the liver of cattle fed *Brachiaria brizantha* hay. **Vet. Human toxicol.**, v. 45, p.163-164, 2003.

VIANA, R.O.; BORGES, I., Ovinos na Braquiária. **Revista Brasileira de Caprino & Ovinos: O berro**. n.96, p.94-98, 2006a.

VIANA, R.O.; BORGES, I., Ovinos na Braquiária. **Revista Brasileira de Caprino & Ovinos: O berro**. n.94, p.63-68, 2006b.

WISLOFF, H.; WILKINS, A.L.; SCHEIE, E. and FLAOYEN, A. Accumulation of sapogenin conjugates and histological changes in the liver and kidneys of lambs suffering from alveld, a hepatogenous photosensitization disease of sheep grazing *Nartheicum ossifragum*. **Vet. Res. Com.**, v.26, p381-396, 2002.

YAGER, S.A.; SCOOT, D.W. The skin and appendages. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. ; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4ed. San Diego: Academic, v.2, cap. 5, 1993. p.531-738.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A intoxicação por braquiária em ovinos é caracterizada por sinais clínicos diversos, em graus variáveis. Os níveis de AST e GGT são úteis para detectar a existência de hepatotoxicidade da gramínea para ovinos, mas não podem ser associados às manifestações clínicas. Foi característica a presença de macrófagos espumosos no fígado de todos animais deste experimento, muitas vezes, a único achado microscópico relevante. Os maiores níveis de saponina esteroidal nas pastagens estavam associados a maior severidade e velocidade de surgimento da intoxicação.

Os resultados do presente estudo foram capazes de comprovar algumas afirmações clínicas que não haviam sido fundamentadas até então. Entre elas, ficou claro que a brotação é a fase mais tóxica devido a maior concentração de saponina esteroidal. Outra contribuição é a descrição de uma nova forma clínica da

intoxicação denominada hiperaguda. Os conhecimentos gerados vão permitir num futuro desenvolver melhores formas de manejo das pastagens de braquiária, para que possam ser utilizadas com segurança para ovinos. É necessário determinar as diferenças entre a susceptibilidade dos animais a se intoxicarem. Possivelmente existam mecanismos adquiridos ou hereditários responsáveis pela maior resistência individual e que necessitam ser conhecidos e caracterizados visando selecionar rebanhos resistentes. Outra frente para se investigar é caracterizar quais são os níveis máximos de saponinas nas pastagens que ovinos podem suportar sem interferir na produtividade dos rebanhos. Isto permitiria selecionar variedades da forrageira com menores níveis de saponina, minimizando as perdas econômicas.

Por fim, a braquiária, apesar dos problemas de toxicidade, permitiu a grande expansão da pecuária nacional ao aproveitar vastas áreas de terra pouco férteis, em especial, na região Centro-Oeste. É premente que as perdas provocadas pelo uso da gramínea sejam minimizadas. Para tal, novas pesquisas devem centrar esforços nas questões acima descritas, permitindo assim, a expansão sustentável da ovinocultura nacional.

ANEXOS

Toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* a ovinos

Helvécio L. Santos Júnior, Augusto R.C. Moscardini, Ana Luiza S. Vieira, Giane R. Paludo,
José R.J. Borges, Franklin Riet-Correa e Márcio B. de Castro

Santos Júnior H.L., Moscardini A.R.C., Paludo G., Riet-Correa F., Borges J.R.J. & Castro M.B. 2008. **[Toxicity of different growing stages of *Brachiaria decumbens* in sheep]**. Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: mbcastro@unb.com.br

Introdução. A intoxicação causada pela ingestão de *Brachiaria decumbens* é caracterizada por fotossensibilização hepatógena, ocorrendo freqüentemente em ovinos e bovinos. Vários surtos vem sendo descritos no Centro-Oeste, especialmente no início do período chuvoso, porém os fatores que possam influenciar na toxicidade da gramínea são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho é caracterizar a toxicidade para ovinos de pastagens de *Brachiaria decumbens* em diferentes estágios de crescimento vegetativo. **Material e métodos.** Foram utilizados 21 ovinos, machos, 4 meses de idade, divididos em três lotes (P, M e G), de sete animais (n=7) por 2 meses. No piquete P, M e G a *B. decumbens* tinha 15, 45 e 90 dias de crescimento respectivamente. Estes ovinos eram provenientes de criatórios onde nunca tiveram contato com *Brachiaria* spp. Três vezes por semana foi realizado o exame clínico dos animais e semanalmente foram colhidas amostras de sangue para mensuração dos níveis séricos das enzimas AST e GGT. Os ovinos que morreram durante o experimento foram necropsiados. Os animais que apresentaram sinais clínicos severos da intoxicação foram retirados do experimento e realizada biópsia hepática guiada por ultra-som. Amostras das pastagens dos três piquetes foram colhidas para contagem de esporos do fungo *Phytomyces chartarum*. **Resultados.** Os principais sinais clínicos observados nos ovinos intoxicados foram apatia (10/21), edema de face (2/21), edema de orelha (2/10), secreção ocular bilateral (5/21), mucosa ocular ictérica (10/21), mucosa ocular hiperêmica (17/21), fotofobia (2/21) e emagrecimento (12/21). O aumento de AST e GGT ocorreu no grupo P e M na terceira semana após o início do experimento, enquanto que no grupo G o aumento ocorreu somente na quinta semana. Após o pico, houve uma queda dos níveis destas enzimas. Na macroscopia dos animais necropsiados (9/21) a icterícia variou de ausente (6/9) a moderada (3/9). Observou-se aumento do fígado e impressão das costelas. Na análise microscópica observou-se tumefação de hepatócitos, macrófagos com citoplasma espumoso difusamente no interior de sinusóides, discreta colestase e infiltrado inflamatório mononuclear periportal. No

citoplasma de muitos destes macrófagos, havia imagens negativas de estruturas cristalóides aciculares. Presença de cristais na luz de ductos biliares e metaplasia do epitélio dos ductos foram observadas em dois animais do grupo P e em um animal do grupo M. Degeneração hidrópica das células epiteliais de túbulos renais foi observada em alguns animais. Nas colheitas de capim para contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum*, os resultados foram menores que 5000 esporos/g de pastagem fresca, em todas as amostras e durante todo o experimento. **Discussão e conclusões.** Os sinais clínicos, resultados da mensuração das enzimas hepáticas, achados de necropsia e histopatologia são característicos de intoxicação por *B. decumbens*. Lesões típicas de fotossensibilização secundária foram observadas em apenas dois animais do grupo P, que se intoxicaram em apenas 7 dias do início do experimento. Possivelmente, ovinos que nunca tiveram contato com a gramínea são mais susceptíveis a intoxicação, apresentando forma hiperaguda, sem fotossensibilização. As lesões histopatológicas observadas no fígado foram mais intensas em animais que se intoxicaram mais gravemente no início do experimento (grupo P e M). Dos 21 ovinos deste experimento, apenas 2 animais do grupo P (28,6%), 3 animais do grupo M (42,9%) e 4 animais do grupo G (57,1%) não adoeceram. Os resultados sugerem que *Brachiaria decumbens*, embora seja tóxica para ovinos em qualquer fase de seu desenvolvimento, possui maior toxicidade aos 15 dias de crescimento, coincidindo com o período de brotação intensa.

Referências

- Driemeier D., Colodel E.M., Seitz A.L., Barros S.S. & Cruz C.E.F., 2002. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon* 40: 1027-1031.
- Riet-Correa, F & Méndez, M.D.C. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas, p.99-221. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Lemos, R.A.A. & Borges, J.R.J. Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. vol. 2. 3 ed. Palotti. 694p. **Termos de Indexação:** doenças de ovinos, *Brachiaria decumbens*, intoxicação, fotossensibilização.