



**KIYOKO UEMURA UTIUMI**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*BRACHIARIA DECUMBENS* EM COELHOS**

**LAVRAS – MG  
2017**

**KIYOKO UEMURA UTIUMI**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *BRACHIARIA DECUMBENS*  
EM COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade animal e Saúde coletiva, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Utiumi, Kiyoko Uemura.

Intoxicação experimental por *Brachiaria Decumbens* em coelhos /  
Kiyoko Uemura Utiumi. - 2017.

50 p.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Lectino-histoquímica. 2. Fotossensibilização hepatógena. 3.  
Modelo experimental. I. Peconick, Ana Paula. . II. Título.

**KIYOKO UEMURA UTIUMI**

**INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *BRACHIARIA DECUMBENS*  
EM COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade animal e Saúde coletiva, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de julho de 2017.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Mary SuzanVaraschin	UFLA
Dr. Flademir Wouters	UFLA
Dra. Lidiane Orlandi	UNILAVRAS
Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters	UFLA
Dr. Antônio de Pádua Lima	UNILAVRAS

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2017**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pois sem o apoio de vocês, o início e a conclusão do doutorado não seriam possíveis. Ao DJ, meu marido, pelo apoio incondicional em tudo, sem a sua paciência também não seria possível. À minha querida filhota, que por vezes fiquei ausente e tive a sua compreensão e o seu carinho sempre.

À Mary Suzan Varaschin, que inicialmente me aceitou como orientada, agradeço imensamente.

À querida Ana Paula Peconick, minha orientadora, a quem devo muito pela sua paciência e compreensão sempre. É a professora em quem me espelho para seguir em minha carreira de docente. É a pessoa que me ensinou que no final tudo dá certo!!! Que se tornou muito mais que minha orientadora, uma amiga para a vida.

Aos queridos amigos Cynthia, Lucas Januzzi, Karen e Camila, que sempre me apoiaram e incentivaram, desde as escolhas das disciplinas aos grupos de trabalho. E na vida também, sempre essenciais no meu dia a dia, pois rir também faz parte, e vocês são os melhores.

À todos os professores e colegas do Setor de Patologia da UFLA, por me acolherem em todos os momentos do doutorado.

A Deus, pois sem Ele nós nada seríamos...

## RESUMO

*Brachiaria* spp. são forragens que compõem grande parte das pastagens no Brasil, devido ao fácil cultivo, boa resistência à seca e adaptação a diferentes solos e baixo custo de manutenção. Entretanto, a ingestão desta gramínea está relacionada a surtos de fotossensibilização em bovinos e ovinos, ocasionando prejuízos econômicos significativos. Os efeitos hepatotóxicos relacionados à ingestão da gramínea são: a formação de cristais e macrófagos espumosos causados pelo acúmulo de metabólitos tóxicos, levando a alterações no sistema biliar, ocasionando a retenção de fileritina e, conseqüentemente, a fotossensibilização com as lesões de pele. Comumente, observam-se durante a necropsia em bovinos e ovinos, diferentes graus de icterícia e aumento de volume do fígado e coloração amarela acastanhada. À observação histológica, as lesões hepáticas são compostas por vacuolização e tumefação ou necrose individual de hepatócitos, bilestase, proliferação de ductos e canalículos biliares, cristais birrefringentes e de macrófagos espumosos isolados ou pequenos agrupamentos. Alterações histológicas semelhantes às achadas em ruminantes também foram descritas no fígado de coelhos intoxicados naturalmente em pastagens de *B. decumbens*; contudo, em repetições experimentais não foi possível reproduzir a lesão hepática. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade de coelhos como modelo experimental para a intoxicação por *B. decumbens*, através da reprodução das lesões hepáticas causadas pela intoxicação. Foram realizados dois experimentos: no primeiro, os animais não apresentaram sinais clínicos e nem alterações macroscópicas e microscópicas de intoxicação por *B. decumbens*. Os coelhos do experimento 2 também não desenvolveram sinais clínicos e lesões macroscópicas, no entanto, na histologia foi possível observar macrófagos espumosos isolados ou em pequenos grupos no fígado e em linfonodos mesentéricos. Quando estes foram submetidos à técnica de lectino-histoquímica, apresentaram alta reatividade para as lectinas sWGA, RCA-I, WGA e GSL, ressaltando assim a importância deste trabalho, por demonstrar lesões histopatológicas por *Brachiaria* spp em experimentos com coelhos, demonstrando que esta espécie animal pode ser utilizada como modelo experimental.

**Palavras-chave:** Lectino-histoquímica. Fotossensibilização hepatógena. Modelo experimental. Macrófago espumoso.

## ABSTRACT

*Brachiaria* spp. are fodder that makes up a large part of pasture in Brazil, due to the easy cultivation, good resistance to drought, good adaptation to different soils and low maintenance cost. However, this grass ingestion is related to photosensitization outbreaks, in bovine and ovine, mainly, causing significant economic losses. The hepatotoxic effects related to the grass ingestion are: the crystals formation and foamy macrophages caused by the accumulation of toxic metabolites, leading to changes in the biliary system causing phylloerythrin retention, and consequently the photosensitization with the skin lesions. In bovine and ovine, commonly, it is observed at necropsy different degrees of jaundice and increased liver size with brownish-yellow coloration. On histological observation, hepatic lesions are composed of vacuolization and swelling or individual necrosis of hepatocytes, biliary system, proliferation of ducts and biliary canaliculi, birefringent crystals and isolated foamy macrophages or small clusters. Histological changes, similar to findings in ruminants, were also described in the liver of naturally intoxicated rabbits in *B. decumbens* pastures, but in experimental replicates it was not possible to reproduce the liver injury. Therefore, the objective in this present study was to evaluate the sensitivity of rabbits as an experimental model for *B. decumbens* intoxication, by reproduction of hepatic lesions caused by intoxication. Two experiments were carried out, in the first, the animals showed no clinical signs and no macroscopic and microscopic alterations of *B. decumbens* intoxication. The rabbits of experiment 2 also did not develop clinical signs and macroscopic lesions, however, in histology it was possible to observe foamy macrophages isolated or small clusters in the liver and in mesenteric lymph nodes. When they were submitted to lectin-histochemistry technique, they showed high reactivity for the sWGA, RCA-I, WGA and GSL lectins, thus highlighting the importance of this work, since it showed histopathological lesions by *Brachiaria* spp in experiments with rabbits, demonstrating that this animal species can be used as an experimental model.

**Keywords:** Lectin-histochemistry. Hepatogenic photosensitization. Experimental model. Foamy macrophages.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

AST	aspartato aminotransferase
<i>B. brizantha</i>	<i>Brachiaria brizantha</i>
<i>B. decumbens</i>	<i>Brachiaria decumbens</i>
<i>B. humidicola</i>	<i>Brachiaria humidicola</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Con-A	<i>Canavalia ensiformis</i> agglutinin
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin
g	grama
GGT	gama glutamiltransferase
GSL	<i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>
HE	hematoxilina e eosina
Kg	quilograma
LCA	<i>Lens culinaris</i> ou <i>Lens esculenta</i>
<i>P. chartarum</i>	<i>Pithomyces chartarum</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PHA-L e PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> agglutinin
PSA	<i>Pisum sativum</i>
RCA-I	<i>Ricinus communis</i> agglutinin-I
SBA	<i>Glicine max</i> agglutinin
SJA	<i>Sophora japonica</i>
sWGA	Succinyl-WGA
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I
UFLA	Universidade Federal de Lavras
WGA	<i>Triticum vulgaris</i> agglutinin

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Fotossensibilização .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Brachiaria</i> sp. ....</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Princípio tóxico e patogenia.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Sinais clínicos e achados de necropsia e histopatologia .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6</b>	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>23</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>24</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....</b>	<b>29</b>
	<b>ARTIGO 1 - Intoxicação experimental por <i>Brachiaria decumbens</i> em coelhos .....</b>	<b>29</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Grande parte das pastagens do Brasil é composta por *Brachiaria* spp., principalmente as espécies *B. decumbens* e *B. brizantha*, consideradas importantes como fontes de forragem para ruminantes (ASSIS et al., 2003), devido à alta produção de matéria seca, fácil cultivo, boa resistência à seca, boa adaptação a diferentes solos, baixo custo de manutenção e crescimento durante a maior parte do ano (CASTRO et al., 2011). Entretanto, anualmente são relatados surtos de fotossensibilização causados pela ingestão dessas gramíneas em diversas espécies animais, especialmente em bovinos e ovinos. Conseqüentemente, acarretam prejuízos econômicos significativos, além de diminuição da produtividade dos rebanhos brasileiros (TOKARNIA et al., 2012).

Os efeitos hepatotóxicos causados pela ingestão de *B. decumbens* estão relacionados à formação de cristais e lesões celulares causadas pelo acúmulo de metabólitos tóxicos. As alterações no sistema biliar levam à retenção de filoeitrina e, conseqüentemente, à fotossensibilização, com lesões de pele (TOKARNIA et al., 2012). No entanto, ainda é desconhecida a quantidade exata de ingestão de *Brachiaria* spp. responsável pelos casos de fotossensibilização (MENDONÇA et al., 2008). Em relação à sensibilidade à intoxicação pela planta, os ovinos, quando comparados aos bovinos, são mais sensíveis (RIET-CORREA et al., 2011; SANTOS et al., 2008). Os animais adultos são considerados menos sensíveis que animais jovens (ALBERNAZ et al., 2010; BRUM et al., 2007). Um surto no estado do Mato Grosso do Sul com mortalidade em coelhos e cordeiros mantidos em pastagem de *B. decumbens*,

demonstram que coelhos também são sensíveis aos efeitos tóxicos da ingestão de *Brachiaria* spp. (SOUZA et al., 2012).

Nos achados de necropsia em bovinos e ovinos, são observados diferentes graus de icterícia, aumento de volume do fígado com coloração amarelo acastanhado (SANTOS et al., 2008). Ao exame microscópico, as lesões hepáticas são compostas por vacuolização e tumefação ou necrose individual de hepatócitos, bilestase, proliferação de ductos e canalículos biliares, cristais birrefringentes e presença de macrófagos espumosos possivelmente oriundos de metabólitos de saponinas esteroidais (DRIEMEIER et al., 1998). Alterações histológicas, semelhantes aos achados em ruminantes, também foram descritas no fígado de coelhos intoxicados naturalmente em pastagens de *B. decumbens* (SOUZA et al., 2012); contudo, em repetições experimentais não foi possível reproduzir a lesão hepática (FACIN et al., 2016).

O diagnóstico da fotossensibilização é baseado nos achados epidemiológicos associados ao quadro clínico-patológico apresentado pelos animais, bem como a inspeção das pastagens para identificação da presença e quantidade da planta (TOKARNIA et al., 2012). Exames bioquímicos da atividade de enzimas hepáticas, especialmente de gama glutamiltransferase (GGT), podem auxiliar no diagnóstico inicial da fotossensibilização (BRUM et al., 2007). No entanto, o exame histopatológico ainda é utilizado rotineiramente no estabelecimento do diagnóstico da doença, em função das lesões características observadas no fígado dos animais acometidos (DRIEMEIER et al., 1998). Em associação com a histologia, também podem ser utilizadas técnicas de lectino-histoquímica (DRIEMEIER et al., 1998). O grupo de lectinas, especialmente a aglutinina de amendoim (PNA), atua como marcadores específicos de resíduos de hidratos de carbono do conteúdo celular de macrófagos espumosos em tecidos de animais mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. (GOMAR et al., 2005).

Algumas espécies animais são utilizadas para intoxicações experimentais, como os ovinos (DRIEMEIER et al., 2002); a utilização de outros modelos experimentais, como os coelhos, confere ainda mais vantagens, pois estes são de fácil manejo e manutenção, menor custo e rápido ciclo reprodutivo (THOMPSON et al., 1983).

A elaboração de um modelo experimental, utilizando coelhos intoxicados experimentalmente com *B. decumbens*, tem como principal finalidade reproduzir as lesões hepáticas características manifestadas em bovinos e ovinos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fotossensibilização

A fotossensibilização possui como característica uma exagerada sensibilidade do animal aos raios solares, causada por um agente fotossensibilizador, geralmente um pigmento fluorescente (TOKARNIA et al., 2012).

Existem, basicamente, dois tipos de fotossensibilização: a primária e a secundária, ambas relacionadas ao agente fotossensibilizador na corrente sanguínea. A fotossensibilização primária é causada por planta, na qual possui um pigmento pré-formado que é absorvido pela mucosa intestinal, atravessa a barreira hepática e em seguida atinge a pele pela circulação, levando a uma sensibilidade aos raios solares (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). Na fotossensibilização secundária ou hepatógena causada por planta, ocorre alterações no parênquima hepático ou nos ductos biliares. Essa alteração interfere no mecanismo de eliminação do pigmento filoeitrina através da bile, pigmento este, que é fluorescente e formado a partir da clorofila e modificado pela ação da microbiota existente no rúmen, retículo e omaso dos ruminantes (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). As lesões hepáticas levam ao acúmulo desse pigmento no organismo que, via circulação sistêmica, alcança a pele e ocasiona a hipersensibilidade aos raios solares no animal (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012).

Independente do tipo de fotossensibilização, as lesões de pele são semelhantes, principalmente afetando as regiões menos pigmentadas e desprotegidas por pelos ou lã (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). Dentre as plantas que causam fotossensibilização secundária, destaca-se o gênero *Brachiaria* spp., devido à sua ampla ocupação nas pastagens brasileiras,

sendo considerada importante fonte de forragem para ruminantes (MENDONÇA et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). A grande maioria dos surtos de fotossensibilização é verificada em pastagens de *B. decumbens* (BRUM et al., 2007; FAGLIARI et al., 1993; LEMOS et al., 1996; LEMOS; SALVADOR; NAKAZATO, 1997) e em menor proporção em *B. brizantha* (ALBERNAZ et al., 2010; LEMOS et al., 1998; MUSTAFA et al., 2012).

## **2.2 *Brachiaria* sp.**

As gramíneas do gênero *Brachiaria* spp. foram originadas na África Equatorial e distribuídas, principalmente, em áreas tropicais (ASSIS et al., 2003; SEIFFERT, 1980). Dentre as espécies desse gênero, destacam-se no Brasil, as pastagens formadas por *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* (ASSIS et al., 2003; SEIFFERT, 1980). Na década de 70, a *B. decumbens* tornou-se a gramínea mais comum na região do cerrado brasileiro, devido à introdução de variedade australiana da planta, que obteve excelente adaptação às condições do solo e clima do país (NAZÁRIO et al., 1977; SEIFFERT, 1980).

Entretanto, a partir dessa época, foram observados surtos de fotossensibilização em bovinos e ovinos mantidos em pastagens com *B. decumbens*, principalmente em pastagens compostas por sementes australianas (DÖBEREINER et al., 1976; DRIEMEIER et al., 1999; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). Acreditava-se que os surtos de fotossensibilização em ruminantes, decorrentes da ingestão dessa gramínea, estavam relacionados com a presença do fungo *Pithomyces chartarum* (SCHENK; SCHENK, 1983; TOKARNIA et al., 2012), devido à intensa esporulação deste fungo em folhas da *B. decumbens*, que foi isolado em cultura. Este fungo produz a esporidesmina, substância tóxica, que provocava o “eczema facial” em ruminantes e eqüinos (AMARAL; NAZÁRIO; ANDRADE, 1976).

Alterações histológicas, associadas à colangio hepatopatia, com presença de cristais em cordeiros foram induzidas após administração oral de extratos de *B. decumbens* (CRUZ et al., 2001). Sallam Adlah et al. (1992), isolaram um extrato de saponinas do conteúdo ruminal de ovinos intoxicados por *B. decumbens*. Confirmou-se que esta forrageira pode induzir lesões hepáticas sem o envolvimento da esporidesmina, do fungo *P. chartarum*, e que as lesões histológicas observadas eram semelhantes às produzidas por saponinas esteroidais contidas em plantas como *Tribulus terrestris* e *Panicum* spp. (CRUZ et al., 2001; LAJIS et al., 1993; SALLAM ABDULLAH et al., 1992). Segundo Tokarnia et al. (2012), os surtos da doença deixaram de ser associados ao *P. chartarum*, em função da pequena quantidade de esporos desse fungo e ausência de comprovação da sua toxigenicidade nas pastagens de braquiárias, bem como nas diferenças epidemiológicas e clínico-patológicas encontradas. Portanto, hoje é conhecido que a fotossensibilização é causada pelas próprias forrageiras (MENDONÇA et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012).

### **2.3 Princípio tóxico e patogenia**

As saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário vegetal, relacionadas ao sistema de defesa. São encontradas em tecidos mais vulneráveis ao ataque de fungos, bactérias ou insetos (WINA; MUETZEL; BECKER, 2005).

O princípio tóxico presente nas *Brachiarias* é um componente da própria planta, identificado como sendo uma saponina litogênica, que causa hepatotoxicidade, obstrução dos ductos biliares e fotossensibilização (ALBERNAZ et al., 2010; BRUM et al., 2007; DRIEMEIER et al., 1999; GRAYDON; HAMID; ZAHARI, 1991; LEMOS; SALVADOR; NAKAZATO, 1997; MUSTAFA et al., 2012; PORTO et al., 2013; SALAM ABDULLAH et

al., 1992; SANTOS JÚNIOR, 2008; WISLOFF et al., 2002). Tais saponinas contribuem para a formação de cristais no sistema biliar. A hidrólise das braquiárias, ao transitar pelo sistema digestório dos animais, resulta nas sapogeninas eepismilagenina e episarsasapogenina, que se conjugam com o ácido hialurônico, formando glicuronídeos, que se ligam aos íons cálcio e formam sais insolúveis que se depositam na forma de cristais nas células do fígado e ductos biliares e associadas à colangite e fotossensibilização (MEAGHER et al., 1996, 2001).

BRUM et al. (2007), isolaram pela primeira vez a saponina litogênica, protodioscina, em um surto em que sete ovinos foram acometidos e 6 animais morreram, sendo esta a principal saponina encontrada em *Brachiaria* spp. (BRUM et al., 2009; CASTRO et al., 2009; MUSTAFA et al., 2012; SATURNINO et al., 2010). Os surtos nos ovinos ocorreram em pastagens com 2,36% de protodioscina e ausência de manifestação clínica nos animais que pastejavam áreas que continham 1,63% dessa substância (BRUM et al., 2007).

A quantidade exata de ingestão de *Brachiaria* spp. responsável pelos casos de fotossensibilização ainda é desconhecida, no entanto, pode estar associada ao teor de saponinas esteroidais presentes nas gramíneas, que parece depender do clima, varia de acordo com a fase de desenvolvimento da gramínea. As maiores quantidades de saponina foram encontradas durante a estação chuvosa (BRUM et al., 2007; MUSTAFA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS JÚNIOR, 2008), tendo a fase de vida da planta influência sobre a quantidade de saponina na mesma, porém houve divergência. Santos Júnior (2008) observaram maior concentração de saponina durante a fase de brotação, entretanto maiores concentrações na fase de queda das sementes foram encontradas por outros autores (BRUM et al., 2006, 2007; DRIEMEIER et al., 1998; MUSTAFA et al., 2012; SATURNINO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012).

Os efeitos hepatotóxicos, causados pela ingestão de *B. decumbens*, possivelmente estão relacionados à formação de cristais e lesões celulares causadas pelo acúmulo de metabólitos tóxicos (TOKARNIA et al., 2012). As alterações no sistema biliar levam à retenção de filioeritrina e o aparecimento das lesões cutâneas (MENDONÇA et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). Segundo Driemeier (1998), provavelmente o conteúdo dos macrófagos espumosos encontrados no fígado, sejam oriundos de metabólitos de saponinas esteroidais.

#### **2.4 Epidemiologia**

A fotossensibilização decorrente da intoxicação por *Brachiaria* spp. tem sido observada principalmente em bovinos (DRIEMEIER et al., 1998) e ovinos (BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008). Casos da doença, associada ao consumo de *B. humidicola*, também foram descritos em eqüinos (BARBOSA et al., 2006), caprinos (LEMO et al., 1998) e búfalos (RIET-CORREA et al., 2007).

Em bovinos, a doença pode afetar animais de até dois anos de idade, incluindo bezerros lactentes com 20 a 45 dias de idade, devido ao início da ingestão dessa gramínea (TOKARNIA et al., 2012). Na espécie ovina, animais jovens ou recém-desmamados apresentam maior susceptibilidade à intoxicação, no entanto, qualquer faixa etária pode ser acometida (SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012). Em relação à sensibilidade de intoxicação pela planta, os ovinos, quando comparados aos bovinos, são relativamente mais sensíveis (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). Souza et al. (2012) relataram que, no estado do Mato Grosso do Sul, a ocorrência simultânea de mortalidade em coelhos e cordeiros mantidos em uma mesma pastagem de *B. decumbens*, mostra que esta espécie também é sensível aos efeitos tóxicos da saponina.

No Brasil, a maioria dos surtos ocorre no início das estações chuvosas, quando as pastagens se encontram verdes, principalmente quando são introduzidos animais muito sensíveis em pastos de braquiárias. Possivelmente, em função de teores mais elevados de saponinas nas pastagens nesse período do ano (TOKARNIA et al., 2012).

## **2.5 Sinais clínicos e achados de necropsia e histopatologia**

O aparecimento dos sinais clínicos é variável, podendo estar relacionados com a quantidade de saponinas nas pastagens, conforme a época do ano, manejo das forrageiras e estado fisiológico dos animais (SANTOS et al., 2008).

As lesões que ocorrem na pele são características e ocorrem, principalmente, em áreas de pele despigmentada ou desprotegida de pelo ou lã, e o aparecimento das lesões é muito rápido (SATURNINO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012). Os animais com quadro clínico de fotossensibilização evitam exposição ao sol, apresentam apatia, apetite diminuído, inquietação e emagrecimento progressivo, e geralmente, icterícia generalizada e bilirrubinúria (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012). De uma forma geral, as lesões cutâneas são evidenciadas após exposição ao sol e são caracterizadas, inicialmente, por áreas dolorosas de eritema e edema da pele, podendo ocorrer acometimento do tecido do subcutâneo. Secundariamente, ocorre espessamento das regiões afetadas da pele, com formação de exsudato e crostas, seguidas de necrose e gangrena seca com posterior desprendimento cutâneo (MENDONÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000; TOKARNIA et al., 2012). Há casos hiperagudos caracterizados por rápida depressão, ausência de icterícia, hiperemia das mucosas, edema facial e de orelha e morte rápida, relatado em ovinos (SANTOS et al., 2008).

Em animais com pelagem escura não ocorrem lesões características de pele, entretanto manifestam edema de face, edema periocular com epífora e conjuntivite (MUSTAFA et al., 2012; SANTOS et al., 2008).

Em ovinos, a fotodermatite pode levar à formação crostosas com ulceração e edema nas orelhas, face e pálpebras (MENDONÇA et al., 2008; SATURNINO et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Nessa espécie, a ocorrência de retração cicatricial das orelhas pode ocorrer como seqüelas da fotossensibilização, popularmente denominadas “orelhas encartuchadas” (TOKARNIA et al., 2012).

Nos achados de necropsia, além das lesões de pele, usualmente são observados diferentes graus de icterícia, bem como fígado aumentando de volume com coloração amarelado acastanhado e vesícula biliar distendida com bile espessada (MENDONÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010). Em casos mais crônicos, pode haver áreas de fibrose com aumento da consistência hepática (SANTOS et al., 2008). Em ovinos, o fígado pode apresentar pontos esbranquiçados na cápsula e na superfície de corte (MENDONÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2008) e, ainda, estriações circundadas por halo avermelhado nos linfonodos hepáticos e mesentéricos (DRIEMEIER et al., 1998). Os rins podem estar escurecidos e a urina pode apresentar alterações de coloração, devido à deposição de bilirrubina (SANTOS et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012)

Ao exame histológico, as principais alterações são encontradas no fígado, caracterizadas pela presença de grande quantidade de macrófagos espumosos entre os cordões hepáticos (DRIEMEIER et al. 1998; SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010; SOUZA et al., 2012; TOKARNIA et al., 2012). Entretanto, a visualização desses macrófagos não necessariamente está relacionada ao desenvolvimento de fotossensibilização, apenas indicam ingestão de forrageiras com saponinas esteroidais (TOKARNIA et al., 2012). Em animais

que tiveram morte rápida, causada pela insuficiência hepática, essas células podem não ser visualizadas (MENDONÇA et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012).

Outras alterações microscópicas visualizadas no fígado consistem em vacuolização e tumefação difusa ou necrose individual de hepatócitos, bilestase e fibrose periportal (DRIEMEIER et al. 1998; MENDONÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012). Ocasionalmente, podem ser visualizados cristais birrefringentes em ductos biliares associados à colangite granulomatosa com presença de células gigantes (DRIEMEIER et al., 1998; SATURNINO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012). E ainda, proliferação de ductos e canalículos biliares e pericolangite mononuclear, principalmente no espaço porta (MENDONÇA et al., 2008; SATURNINO et al., 2010; TOKARNIA et al., 2012). Souza et al. (2012) observaram lesões hepáticas similares, incluindo a presença de macrófagos espumosos e cristais birrefringentes, simultaneamente em fígados ovinos criados extensivamente em pastos de *B. decumbens*.

Na análise de bioquímica sérica, são relatados aumento de enzimas gama glutamiltransferase (GGT) (BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008; SATURNINO et al., 2010) e aspartatoaminotransferase (AST) (SATURNINO et al., 2010), bem como nos níveis de bilirrubina (BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008) em ovinos. Aumento significativo de GGT foi observado em estudos de intoxicação experimental por *B. decumbens* em ovinos que apresentaram quadro clínico de fotossensibilização (SATURNINO et al., 2010). A elevação da atividade de GGT também foi relatada em casos espontâneos de intoxicação pela planta (BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008). Portanto, essa enzima pode estar intimamente relacionada à ocorrência de bilestase (BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008; SATURNINO et al., 2010).

## 2.6 Diagnóstico

O diagnóstico de fotossensibilização causada pela ingestão de *Brachiaria* spp., é baseado nos achados epidemiológicos associados com o quadro clínico-patológico apresentados pelos animais, bem como a inspeção das pastagens para identificação da presença e quantidade da planta (TOKARNIA et al., 2012). É importante considerar diagnósticos diferenciais com outras patologias que cursam com quadros de fotossensibilização, dentre elas a pitomicotoxicose (TOKARNIA et al., 2012). Em alguns casos, pode ser necessária a utilização de exames laboratoriais para complementar o estabelecimento do diagnóstico da doença.

Análises bioquímicas, juntamente com as manifestações clínicas apresentadas pelos animais, podem auxiliar no diagnóstico inicial da doença. O exame da atividade enzimática de GGT pode auxiliar como um método de triagem na identificação prévia de risco de ocorrência de quadros clínicos de intoxicação em rebanhos ovinos (SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010). O aumento das atividades séricas de GGT e AST, a elevação de bilirrubina plasmática em ovinos com lesões de fotossensibilização, podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico da doença (ALBERNAZ et al., 2010; BRUM et al., 2007; CASTRO et al., 2011; PORTO et al., 2013; SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010).

No entanto, os exames histopatológicos ainda são amplamente utilizados no estabelecimento do diagnóstico da doença, em função das lesões características observadas no fígado dos animais acometidos (DRIEMEIER et al., 1998; TOKARNIA et al., 2012). As amostras enviadas para análise microscópica podem ser obtidas durante a necropsia ou através de biópsias hepáticas, possibilitando a investigação da extensão das alterações patológicas (DRIEMEIER et al., 1998; TOKARNIA et al., 2012). Entretanto, as lesões

encontradas no fígado e em linfonodos de bovinos, também podem ser encontradas em animais sadios que não desenvolveram, necessariamente, quadro clínico de fotossensibilização (TOKARNIA et al., 2012). Em casos mais agudos, a intoxicação pode ocorrer sem a presença do quadro de icterícia e dermatite (MUSTAFA et al., 2012; SANTOS et al., 2008), podendo apresentar apatia, anorexia, emagrecimento, hiperemia de mucosa e secreção ocular (SANTOS et al., 2008) além de edema na face e nas orelhas (MUSTAFA et al., 2012).

Microscopicamente, é difícil a distinção entre macrófagos espumosos isolados e hepatócitos em cortes corados com hematoxilina e eosina (DRIEMEIER et al., 1998). Tintorialmente, esses macrófagos não são corados pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS), e fracamente pelo Oilred (DRIEMEIER et al., 1998). Raramente é possível a visualização de imagens negativas de cristais no interior dessas células, possivelmente dissolvidos durante as etapas de processamento das amostras (DRIEMEIER et al., 1998). Também há presença de cristais birrefringentes ou imagens negativas destes cristais em ductos biliares, macrófagos e hepatócitos, e a ocorrência de macrófagos com citoplasma espumoso e núcleo periférico nos sinusóides levando à desorganização dos cordões de hepatócitos. Outros achados incluem tumefação e vacuolização de hepatócitos, edema ou necrose individual de hepatócitos, colestase, proliferação de ductos biliares, infiltrado inflamatório mononuclear periportal, infiltrado neutrofílico focal, pericolangite, células gigantes, e em alguns casos, fibrose periportal (ALBERNAZ et al., 2010; BRUM et al., 2007; COSTA et al., 2013; CRUZ et al., 2000; DRIEMEIER et al., 2002; GRAYDON; HAMID; ZAHARI, 1991; LEMOS et al., 1996; MACÊDO et al., 2008; MUSTAFA et al., 2012; SANTOS et al., 2008; SATURNINO et al., 2010).

Associado ao exame histopatológico pode ser empregada a técnica de imuno-histoquímica, utilizando anticorpos monoclonais para macrófagos pelo

método estreptavidina-biotina (DRIEMEIER et al., 1998). Testes imunohistoquímicos, utilizando anticorpo contra monócitos (MAC 387), foram eficientes na marcação de macrófagos em fígado e linfonodos de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. (GOMAR et al., 2005).

Através da técnica de lectino-histoquímica é possível a determinação de resíduos de hidratos de carbono específicos no interior de macrófagos espumosos em tecidos de animais mantidos em pastagens de *Brachiaria* sp. (GOMAR et al., 2005). As lectinas são caracterizadas por um grupo heterogêneo de proteínas isoladas ou ligadas a carboidratos de origem vegetal ou animal. Dentre as lectinas, destacam-se a aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA) (GOMAR et al. 2005), a aglutinina-I de *Ricinus communis* (RCA-I) (BOABAID et al., 2011), a aglutinina de *Triticum vulgare* (WGA) (BOABAID et al., 2011), e a Succinyl-WGA (sWGA) (MIRANDA et al., 2016), as quais apresentam elevada afinidade pelos macrófagos espumosos, consideradas de eleição como marcadores dessas células.

Uma caracterização aprimorada da intoxicação por *Brachiaria* sp. nos animais pode ser obtida em modelos experimentais (SOUZA et al., 2012). Reprodução experimental da fotossensibilização causada por *P. chartarum* foi descrita em coelhos inoculados com extrato de culturas do fungo (NAZÁRIO et al., 1977). Alterações histológicas também foram relatadas em fígado de coelhos mantidos em pastagens de *B. decumbens*, semelhantes aos achados descritos nos casos de fotossensibilização em ruminantes (SOUZA et al., 2012). Portanto, pode ser possível a utilização de coelhos como modelos experimentais na intoxicação por esta gramínea.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação a fatores éticos, a reprodução da doença em coelhos pode contribuir na substituição de ruminantes intoxicados experimentalmente pela planta. Adicionalmente, é possível o aprimoramento dos estudos envolvendo a patogênese da doença, destacando os principais determinantes envolvidos na intoxicação por *Brachiaria* spp., bem como possivelmente estabelecer uma dose tóxica para as intoxicações. Dessa forma, em trabalhos futuros, pode-se estabelecer como medida preventiva a retirada dos animais das pastagens antes das manifestações clínicas da doença, reduzindo as perdas econômicas decorrentes da fotossensibilização causada por essa forrageira no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, T. et al. Fotossensibilização em ovinos associadas a ingestão e *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, p. 741-748, 2010.
- AMARAL, R.E.; NAZÁRIO, W.; ANDRADE, S.O. Ocorrência do fungo *Pithomyces chartarum* (Berk. ET Curt.) M.B. Ellis em grãos e forrageiras no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 9., 1976, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 1976. p.82.
- ASSIS, G.M.L. et al. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.32, n.3, p.576-584, 2003.
- BARBOSA, J.D. et al. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 147-153, 2006.
- BOABAID, F.M. et al. Lectin histochemistry on sections of liver and hepatic lymph nodes from sheep grazing on *Brachiaria* spp. In: RIET-CORREA F. et al. (Ed.). **Poisoning plants, mycotoxins and related toxins**. London: CAB International, 2011. p.124-128.
- BRUM, K. B. et al. Crystal-associated cholangyopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2007.
- BRUM, K. B. et al. Steroidal saponinns concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 279-281, 2009.
- BRUM, K. B. **Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo**. 2006. 93 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.
- CASTRO, M.B. et al. *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON

- POISONOUS PLANTS, 8., 2009, João Pessoa. **Anais...João Pessoa: ISOPP**, 2009. p.12.
- CASTRO, M.B. et al. *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings. In: RIET-CORREA F. et al. (Ed.). **Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins**. London: CAB International, 2011.
- COSTA, S.Z.R et al. Avaliação lectino-histoquímica de fígado e rim de ovinos com fotossensibilização causada por *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.8, p.955-962, 2013.
- CRUZ, C. et al. Experimentally induced cholangiopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. **Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.13, p. 170-172, 2001.
- CRUZ, C. et al. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.42, n.3, p.142-145, 2000.
- DÖBEREINER, J. et al. Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiaria decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.11, p.87-94, 1976.
- DRIEMEIER, D. et al. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.29-341, 1998.
- DRIEMEIER, D. et al. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.19, n.2, p.79-83, 1999.
- DRIEMEIER, D. et al. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. **Toxicon**, Elmsford, v.40, p.1027-1031, 2002.
- FACCIN, T.C. et al. Evaluation of the toxicity of *Brachiaria decumbens* in rabbits. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.38, n.2, p.143-146, 2016.

FAGLIARI, J.J. et al. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporodesmina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.45, n.3, p. 263-289, 1993.

GOMAR, M.S. et al. Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* sp. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.52, p.18-21, 2005.

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

LAJIS, N.H. et al. Epi-sarssasapogenin and epi-smilagenin: two sapogenins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. **Steroids**, Stoneham, v.58, p.387-389, 1993.

LEMOS, R. A. A. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 507-510, 1998.

LEMOS, R.A.A. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.1, 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. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.39, p.376-377, 1997.

MACÊDO, J.T.S.A. et al. Doenças da pele em caprinos e ovinos no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28 n.12, p.633-642, 2008.

MEAGHER, L.P. et al. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporodesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.38, p.271-273, 1996.

MEAGHER, L.P. et al. Metabolismo diosgenin-derived saponina simplifications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.91, p. 157-170, 2001.

MENDONÇA, F.S. et al. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Graminae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.9, n.4, p.1034-1041, 2008.

MIRANDA, I.C. et al. Avaliação lectino-histoquímica de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.36, n.9, p.798-804, 2016.

MUSTAFA, V.S. et al. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n.12, p.1272-1280, 2012.

NAZÁRIO, W. et al. Intoxicação experimental produzida pelo *Pithomyces chartarum* (Berk & Curt.) M.B. Ellis, Isolado de *Brachiaria decumbens*. **Biológico**, São Paulo, v.43, n.5/6, p.125-131 1977.

OLIVEIRA, C. H.H.S. Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. **Toxicon**, Elmsford, v.73, p.121-129, 2013.

PORTO, M. R. et al. Avaliação da exposição solar na intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.8, p.1009-1015, 2013.

RIET-CORREA, F. E.; MENDEZ, M.C. Intoxicações por plantas e Micotoxinas. In: RIET-CORREA, F. et al. (Ed.). **Doenças de ruminantes e equídeos**. Santa Maria: Palloti, 2007. p. 99-219.

RIET-CORREA, B. et al. *Brachiaria* spp. Poisoning of ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.3, p.183-192, 2011.

SALLAM ABDULLAH, A. et al. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.34, n.2, p. 154-155, 1992.

SANTOS, J.C.A. et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 1-14, 2008.

SANTOS JÚNIOR, H.L. **Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos**. 2008. 65 p. Dissertação

(Mestrado em Veterinária) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2008.

SATURNINO, K.G. et al. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 195-202, 2010.

SCHENK, M.M.A.; SCHENK, J.A.P. **Aspectos gerais da fotossensibilização hepatógena de bovinos**. Campo Grande: Embrapa, 1983. (Comunicado Técnico, 19).

SEIFFERT, N.F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: Embrapa, 1980. 83p. (Boletim Técnico, 1).

SOUZA, R.I.C. et al. Achados incidentais em fígados de coelhos alimentados com *Brachiaria decumbens*. In: ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 7., 2012, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRS, 2012. p.115.

THOMPSON, K. G. et al. Sporodesmin toxicity in rabbits: biochemical and morphological changes. **Journal Comparative Pathology**, Bristol, v. 93, p. 319-329, 1983.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. p. 164-175.

TOKARNIA, C.H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. p. 323-335.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p.8093-8105, 2005.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1**

(Formatação de acordo com as normas da revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Qualis A2 para Medicina Veterinária)

**Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em coelhos<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Recebido em

Aceito para publicação em

<sup>2</sup> Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil.\*Autor para correspondência: anappeconick@dmv.ufla.br

<sup>3</sup> Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA),

<sup>4</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em coelhos. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):000-000. Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brazil.

E-mail:anapeconick@dmv.ufla.br

**ABSTRACT:** 2017.

**[Experimental intoxication by *Brachiaria decumbens* in rabbits]**

*Brachiarias* spp are important forage sources for ruminants, due to the easy cultivation, good resistance to drought, good adaptation to different soils and low maintenance cost. However, this grass ingestion is related to photosensitization outbreaks, in bovine and ovine, mainly, causing significant economic losses. The hepatotoxic effects related to the grass ingestion are: the crystals formation and foamy macrophages caused by the accumulation of toxic metabolites. The use of bovine and ovine in experiments involving the plant presents several obstacles, both in the ethical, economic and in the animal management. The objective in this study was to evaluate the sensitivity of rabbits as an experimental model for *B. decumbens* intoxication. In the present study two experiments were carried out. Experiment 1 used 4 rabbits that received the fresh plant in daily doses of 10, 20, 40 and 80 g/kg body weight for 120 days. Experiment 2 used 3 rabbits receiving the fresh plant in amounts of 500 g daily per animal for 210 days. In experiment 1, the animals showed no clinical signs and no macroscopic and microscopic changes characteristic of *B. decumbens* intoxication. In the experiment 2 the animals also showed no clinical signs and significant macroscopic alterations. In the histological analysis was observed the presence of foamy macrophages isolated or in random clusters of

cells in the liver and mesenteric lymph nodes. Samples of liver and mesenteric lymph nodes of the animals from experiment 2 were submitted to the lectin-histochemistry technique. The WGA, sWGA and RCA lectins showed reactivity in foamy macrophages in both organs. This is the first work of our knowledge that demonstrates histopathological lesions by *Brachiaria* spp conducted experimentally in rabbits, demonstrating its potential as an animal model in this field of study.

**INDEX-TERMS:** Experimental model, hepatogenic photosensitization, lectin-histochemistry, foamy macrophages.

**RESUMO – [Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em coelhos.]**

*Brachiaria ssp* são importantes fontes de forragem para ruminantes, devido ao fácil cultivo, boa resistência à seca, boa adaptação a diferentes solos e baixo custo de manutenção. Entretanto, a ingestão desta gramínea está relacionada a surtos de fotossensibilização em bovinos e ovinos, principalmente, ocasionando prejuízos econômicos significativos. Os efeitos hepatotóxicos relacionados à ingestão da gramínea são a formação de cristais e macrófagos espumosos causados pelo acúmulo de metabólitos tóxicos. A utilização de bovinos e ovinos em experimentos envolvendo a planta apresenta vários empecilhos, tanto no âmbito ético, econômico e no manejo dos animais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade de coelhos como modelo experimental para intoxicação por *B. decumbens*. No presente estudo, foram realizados dois experimentos. O Experimento 1 utilizou quatro coelhos que receberam a planta fresca em doses diárias de 10, 20, 40 e 80 g/Kg de peso vivo durante 120 dias. O Experimento 2 utilizou três coelhos recebendo a planta fresca em quantidades de 500 g diárias por animal com duração de 210 dias. No experimento 1, os animais não apresentaram sinais clínicos e nem alterações macroscópicas e microscópicas características de intoxicação por *B. decumbens*. No experimento 2, os animais também não apresentaram sinais clínicos e alterações macroscópicas significativas. Na análise histológica observou-se presença de macrófagos espumosos isolados ou em grupos aleatórios de células no fígado e nos linfonodos mesentéricos. Amostras de fígado e linfonodos mesentéricos dos animais do experimento 2 foram submetidas à técnica de lectino-histoquímica. As lectinas WGA, sWGA e RCA apresentaram reatividade em macrófagos espumosos nos dois órgãos. Este é o

primeiro trabalho de nosso conhecimento que demonstra lesões histopatológicas por *Brachiaria spp* conduzido de forma experimental em coelhos, demonstrando seu potencial como modelo animal nesse campo de estudo.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Modelo experimental, fotossensibilização hepatógena, lectino-histoquímica, macrófago espumoso.

### **Introdução**

Grande parte das pastagens do Brasil são compostas por *Brachiaria spp.*, principalmente as espécies *B. decumbens* e *B. brizantha*, consideradas importantes como fontes de forragem para ruminantes (ASSIS et al., 2003). Entretanto, anualmente são relatados surtos de fotossensibilização causados pela ingestão dessas gramíneas, em diversas espécies de animais, especialmente em bovinos e ovinos (MIRANDA et al., 2016; TOKARNIA et al., 2012), assim como em caprinos e búfalos, sendo em eqüinos mais raro (BARBOSA et al., 2006). Conseqüentemente acarretam prejuízos econômicos significativos, além de diminuição da produtividade dos rebanhos brasileiros (TOKARNIA et al., 2012).

A hepatotoxicidade da *Brachiaria* se deve à protodioscina, uma saponina esteroidal litogênica, que está presente na planta (BRUM et al., 2007; MIRANDA et al., 2016; RIET-CORREA et al., 2011), podendo causar também a obstrução de ductos biliares e o acúmulo de filioeritrina e conseqüentemente a fotossensibilização com as lesões de pele (BRUM et al., 2007; DRIEMEIER et al., 1999; LEMOS; SALVADOR; NAKAZATO, 1997; MUSTAFA et al., 2012; SANTOS JÚNIOR, 2008; TOKARNIA et al., 2012). Porém, ainda é desconhecida a quantidade exata de ingestão de *Brachiaria spp.* responsável pelos casos de fotossensibilização (MENDONÇA et al., 2008).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas com um ou mais sítios de ligação por subunidade que podem se unir de maneira reversível a resíduos

específicos de carboidratos, e aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos ou glicoproteínas (COSTA et al., 2013). Pode-se utilizar a lectino-histoquímica para o diagnóstico da hepatotoxicidade da *Brachiaria*. Esta, pode detectar algumas substâncias no tecido sobre o qual ocorre a lesão, permitindo uma relação entre a sua extensão e gravidade (COSTA et al., 2013).

Algumas espécies animais são utilizadas para intoxicações experimentais, como os ovinos (DRIEMEIER et al., 2002), que apresentam algumas vantagens em relação aos bovinos, como menor custo de manutenção e mais fácil manejo (THOMPSON et al., 1983). A utilização de outros modelos experimentais, como os coelhos, confere ainda mais vantagens, pois estes são de fácil manejo e manutenção, menor custo e rápido ciclo reprodutivo (THOMPSON et al., 1983).

O objetivo deste trabalho foi elaborar um modelo experimental, utilizando coelhos intoxicados experimentalmente com *B. decumbens* e reproduzir as lesões hepáticas caracteristicamente observadas em bovinos e ovinos.

### **Materiais e Métodos**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFLA sob o protocolo número 078/2013. Foram utilizados coelhos machos da raça Nova Zelândia, com idade inicial de 60 dias, acondicionados em gaiolas individuais com água e ração comercial à vontade. O acesso vegetal da espécie *Brachiaria decumbens* Stapf cv Comum, foi coletada no departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (21°13'52"S e 44°58'32"W) no período matutino. Exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade para consulta.

A amostra da planta foi seca a 40°C em estufa com circulação forçada de ar até peso e umidade constantes com monitoramento diário em balança, Marca OHAUS Switzerland modelo MB 45, devidamente validada pelo

INMETRO. Após peso e umidade constante por três dias consecutivos, as amostras foram trituradas em moinho de facas Marconi modelo em granulometria média.

A presença de umidade e saponina também foram determinadas na amostra de *Brachiaria decumbens*. A umidade diária foi determinada seguindo protocolo de aquecimento a 105°C por 10 minutos e balança Marca OHAUS Switzerland modelo MB 45, devidamente validada pelo INMETRO. A diferença entre peso inicial e final determina a quantidade relativa de água perdida no processo. A metodologia para identificação de saponina na amostra foi determinada por Matos (1988). Alíquota de 1 g da planta seca e pulverizada foi adicionado em tubo de ensaio contando 4 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram aquecidos em temperatura de ebulição por 5 minutos. Em seguida, o tubo de ensaio foi mantido em temperatura ambiente e agitado vigorosamente por 3 minutos. A presença de espuma abundante e persistente indicou presença de heterósides saponínicas. De acordo com protocolo da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, porção de 1 g de planta seca e rasurada e colocada em vidro de relógio com 10 cm de diâmetro e coberta por meio 5 mL Ágar Sangue bovino em solução fisiológica com pH de 7,4 coletado com anticoagulante EDTA. O vidro de relógio foi levado à geladeira por 1 hora e a formação de halo de coloração amarelo ou amarronzado determina hemólise e conseqüentemente presença de saponinas na amostra.

A planta fresca foi coletada diariamente em um mesmo campo e oferecida aos animais, o excedente não consumido era pesado, e então descontado do valor total recebido. Foram realizados dois experimentos distintos: no experimento 1, foram utilizados quatro coelhos, mantidos em gaiolas individuais, recebendo as quantidades de, coelho 1, 10 g/kg, coelho 2, 20 g/kg, coelho 3, 40 g/kg e coelho 4, 80 g/kg de *B. decumbens* fresca. Os coelhos

foram alimentados e acompanhados diariamente durante o período de 120 dias, quando foi realizada a eutanásia e submetidos à necropsia.

No experimento 2 utilizou-se três coelhos. Cada animal recebia 500g diárias de *B. decumbens* fresca, o excedente não consumido era pesado e, então, descontado das 500 g diárias. Este experimento teve duração de 210 dias, quando foram submetidos à eutanásia e necropsiados.

Em ambos os experimentos, fragmentos de diversos órgãos foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10%, processados de forma rotineira para a histopatologia. Fragmentos de fígado e linfonodos dos animais referentes ao experimento 2 foram submetidos à técnica de lectinohistoquímica. As lectinas utilizadas foram: *Canavalia ensiformis* agglutinin (Con-A), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *Glicine max* agglutinin (SBA), *Arachi shypogaea* agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin-I (RCA-I), *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I), *Triticum vulgare* agglutinin (WGA), Succinyl-WGA (sWGA), *Griffonia* (Bandeiraea) *simplicifolia* (GSL), *Sophora japônica* (SJA), *Pisum sativum* (PSA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-L e PHA-E) e *Lens culinaris* ou *Lens esculenta* (LCA).

### Resultados

A planta foi identificada como *Brachiaria decumbens* e exsicata, foi depositada para confirmação botânica e reprodutibilidade do presente trabalho. Na determinação da presença de saponina, observou-se espuma com 5 cm de altura em tubo de ensaio com persistência de aproximadamente 10 minutos. Esse resultado prediz a existência de grande quantidade de heterósides saponínicos na planta pesquisada. Após 30 minutos, foi possível observar halo hemolítico confirmando o resultado dos testes anteriores sobre a presença da saponina (**Fig. 1**).

No experimento 1 os animais não apresentaram sinais clínicos e não foram encontradas alterações macroscópicas e microscópicas características de

intoxicação por *B. decumbens*. A dose tóxica diária ingerida por cada coelho foi de 52 g/Kg no coelho 1, 78 g/Kg no coelho 2, 61 g/Kg no coelho 3 e 133 g/Kg no coelho 4.

No experimento 2 os animais não apresentaram sinais clínicos e alterações macroscópicas significativas. Na análise histológica observou-se a presença de macrófagos espumosos isolados ou em grupos aleatórios de células (**Fig. 2 e 3**), tumefação e vacuolização de hepatócitos, necrose individual de hepatócitos, discreta proliferação de ductos biliares e de proliferação de tecido conjuntivo periportal, associado a infiltrados mononucleares periportais. Em linfonodos mesentéricos foram observados macrófagos espumosos isolados em seios linfáticos (**Fig. 4**) e centros foliculares (**Fig. 5**). A ingestão tóxica diária ingerida por cada coelho foi de 203 g/Kg no coelho 5, 191 g/Kg no coelho 2, e 192 g/Kg no coelho 7.

As amostras de fígado e linfonodo mesentérico dos animais do Experimento 2 submetidas à técnica de lectina-histoquímica estão resumidas no **Quadro 1**. As lectinas sWGA (**Fig. 6**), RCA-I (**Fig. 7**), WGA (**Fig. 8**), GSL apresentaram reatividade e especificidade para macrófagos espumosos presentes no fígado de coelhos intoxicados por *Brachiaria decumbens*. As lectinas Con-A, PNA e PHA-L apresentaram moderada reatividade e especificidade em macrófagos espumosos no fígado. Os macrófagos espumosos observados em linfonodos mesentéricos apresentaram leve reatividade e especificidade para as lectinas sWGA (**Fig. 9**), RCA-I (**Fig. 10**), WGA (**Fig. 11**), Con-A, PNA, PHA-L e PHA-E.

### Discussão

O Experimento 1 demonstrou que doses tóxicas diárias de até 133 g/Kg de peso por até 120 dias não são suficientes para provocar lesões hepáticas de intoxicação por *Brachiaria decumbens* em coelhos, resultados que concordam com outro estudo que utilizou coelhos como modelo

experimental para a doença e também demonstrou que doses e tempos menores também não provocaram sinais clínicos ou lesões (FACCIN et al., 2016). O Experimento 2 demonstrou que doses tóxicas diárias de 190 g/Kg de peso durante 210 dias é suficiente para desenvolver lesões hepáticas de intoxicação por *B. decumbens*.

As lesões encontradas no fígado e linfonodos dos coelhos do Experimento 2 são semelhantes às lesões descritas em casos de intoxicação por *B. decumbens* em ovinos (LEMOS et al., 1996) e bovinos (DRIEMEIER et al., 1998). A lesão mais característica de intoxicação por *Brachiaria* spp. é a presença de cristais birrefringentes em ductos biliares e macrófagos (RIET-CORREA et al., 2011) e a presença de macrófagos espumosos isolados ou em grupos aleatórios no fígado (DRIEMEIER et al., 1998; LEMOS et al., 1996; RIET-CORREA et al., 2010). A presença de macrófagos espumosos no fígado, tanto de forma isolada ou em grupos aleatórios foi o achado mais consistente de intoxicação por *B. decumbens* nos coelhos do Experimento 2, contudo, em nenhum animal foi visualizada a presença de cristais birrefringentes em ductos biliares e macrófagos, o que também é descrito em outros casos de intoxicação por *B. decumbens* (MIRANDA et al., 2016; RIET-CORREA et al., 2010). A presença de macrófagos espumosos em linfonodos mesentéricos é descrita em casos de intoxicação em diferentes espécies de ruminantes, tanto em seios linfáticos (DRIEMEIER et al., 1998; RIET-CORREA et al., 2010) como em centros foliculares (BOABAID et al., 2011; MIRANDA et al., 2016).

A marcação de lectina-histoquímica apresentada pelos coelhos intoxicados por *B. decumbens* apresentou padrão semelhante às marcações em outras espécies. A marcação acentuada em macrófagos espumosos no fígado foi vista principalmente nas lectinas RCA-I, WGA, sWGA e GSL, o que também foi observado em ovinos (BOABAID et al., 2011) e bubalinos

(MIRANDA et al., 2016). Marcações moderadas foram observadas nas lectinas Con-A, PNA e PHA-L, que também foi observado em bubalinos (MIRANDA et al., 2016) e, em ovinos, foram observadas de forma acentuada (BOABAID et al., 2011; COSTA et al., 2013). Enquanto que em macrófagos espumosos em linfonodos as lectinas Con-A, PNA, WGA, sWGA, PHA-L e PHA-E apresentaram marcação leve em coelhos, enquanto que em ovinos e bubalinos apresentaram marcações moderadas a acentuadas (BOABAID et al., 2011; MIRANDA et al., 2016).

Existe na literatura apenas uma descrição de lesões hepáticas contendo macrófagos espumosos, mas ocorreu em um surto de intoxicação natural por *B. decumbens*, em coelhos mantidos em pastagem (SOUZA et al., 2012). O presente estudo experimental, aliado a dados de outro estudo semelhante (FACCIN et al., 2016), demonstram que coelhos apresentam uma maior resistência à intoxicação pela *B. decumbens*, visto que doses de até 130 g/Kg durante um período de ingestão de até 120 dias não desenvolveram lesões em fígado ou linfonodo. Apesar das lesões terem sido observadas em animais que ingeriram doses em torno de 190g/KG durante um período de 210 dias, ainda não foi possível estabelecer a dose tóxica e período mínimo necessários para se observar as lesões hepáticas da intoxicação.

A observação do desenvolvimento de lesões em fígado e linfonodos de coelhos traz grandes avanços, tanto no âmbito ético como econômico, onde será possível a substituição de bovino e ovinos no estudo da intoxicação pela *B. decumbens*. Adicionalmente, é possível o aprimoramento dos estudos envolvendo a patogênese da doença, destacando os principais determinantes envolvidos na intoxicação pela planta.

### **Conclusão**

Os resultados demonstram que é possível a utilização de coelhos como modelos experimentais para estudos de intoxicação experimental por *B. decumbens*, pois foi possível reproduzir as lesões hepáticas com a presença de macrófagos espumosos e também em linfonodos idênticos às lesões encontradas em bovinos e ovinos.

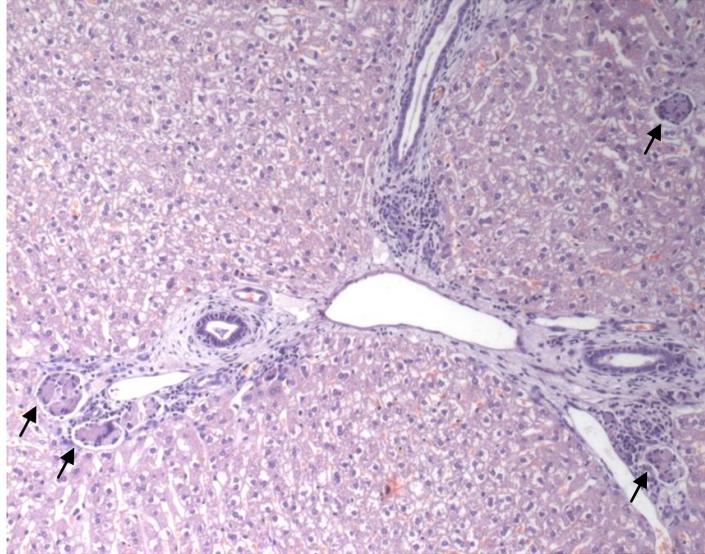
**Quadro 1** - Avaliação lectino-histoquímica do fígado e linfonodo mesentérico de coelhos intoxicados experimentalmente com *Brachiaria decumbens*.

	Macrófagos	Hepatócitos	Ducto biliar	Conteúdo do ducto biliar	Superfície do ducto biliar	Íntima do vaso	Tecido conjuntivo	Linfonodo
Con-A	++*	++	++	-	-	++	-	Macrófago +
DBA	-	-	+	-	-	-	-	-
SBA	+	+	-	-	-	-	-	-
PNA	++	-	+	+	-	-	-	Macrófago +
RCA-I	++/+++	+	++	+++	+	+++	-	Macrófago +
UEA-I	-	-	++	++	-	-	-	-
WGA	++/+++	-	-	+	-	+	++	Macrófago +
sWGA	+++	-	-	-	-	-	-	Macrófago +
GSL	++/+++	-	+	-	-	-	-	-
SJA	-	-	-	-	-	-	-	-
PSA	-	-	-	-	-	+	+	-
PHA-L	+ / ++	-	+	-	-	-	-	Macrófago +
PHA-E	+	-	-	-	-	-	-	Macrófago +
LCA	-	-	-	-	-	-	-	-

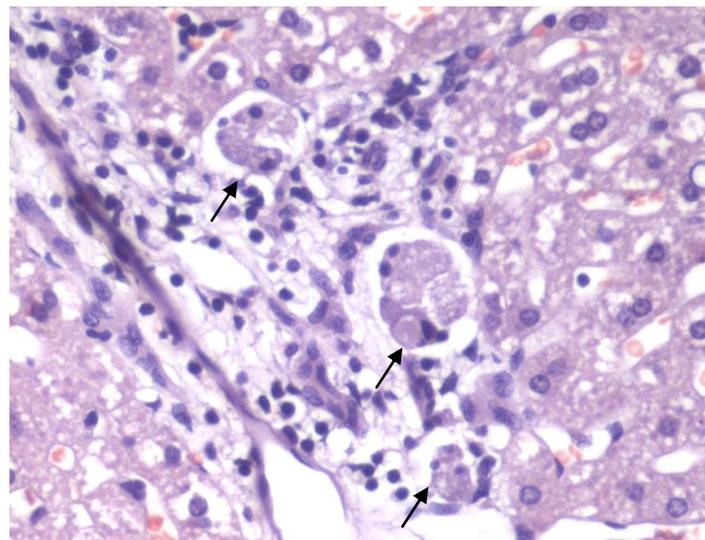
\* +++ Lesão acentuada, ++ lesão moderada, + lesão leve, - lesão ausente



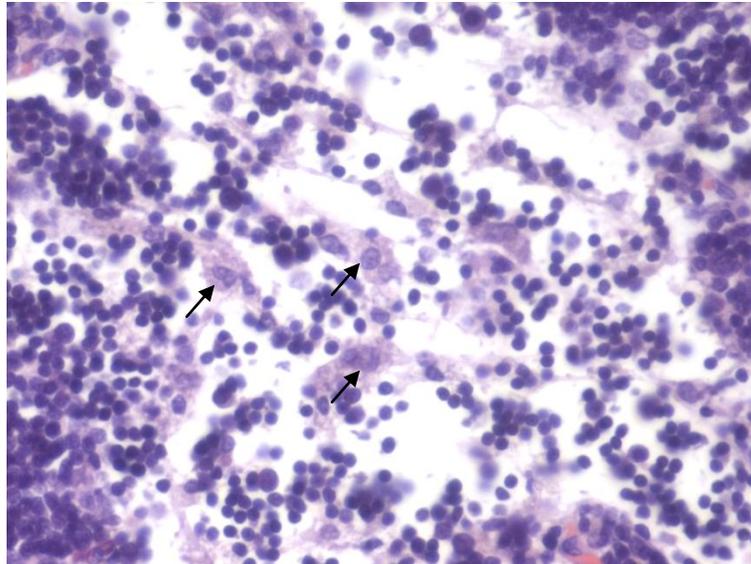
**Figura 1** – Extrato de *Brachiaria decumbens*. Dez minutos após agitação vigorosa e permanência da espuma. Indicativo de saponina.



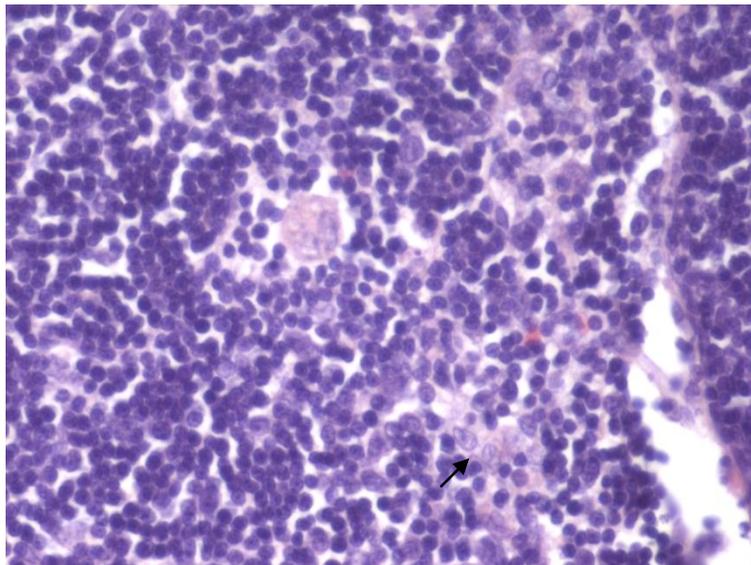
**Figura 2** – Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Fígado. Observam-se numerosos macrófagos espumosos isolados ou em grupos (setas). HE, Obj. 10x.



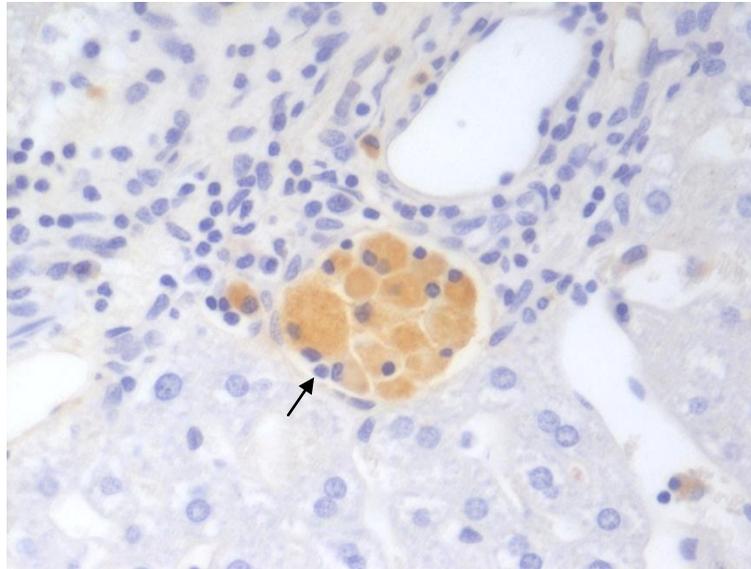
**Figura 3** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Fígado. Observam-se numerosos macrófagos espumosos isolados ou em grupos (setas). HE, Obj. 40x.



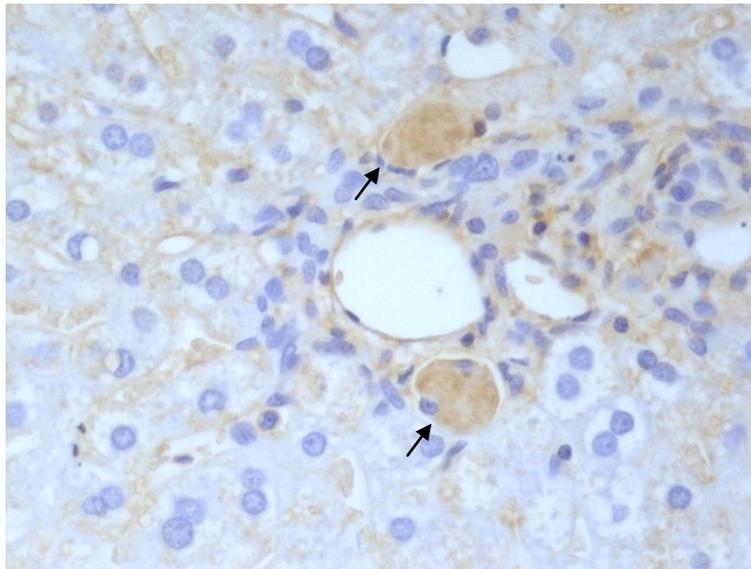
**Figura 4** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Linfonodo Mesentérico. Observam-se macrófagos espumosos isolados em seios linfáticos (setas). HE, Obj. 40x.



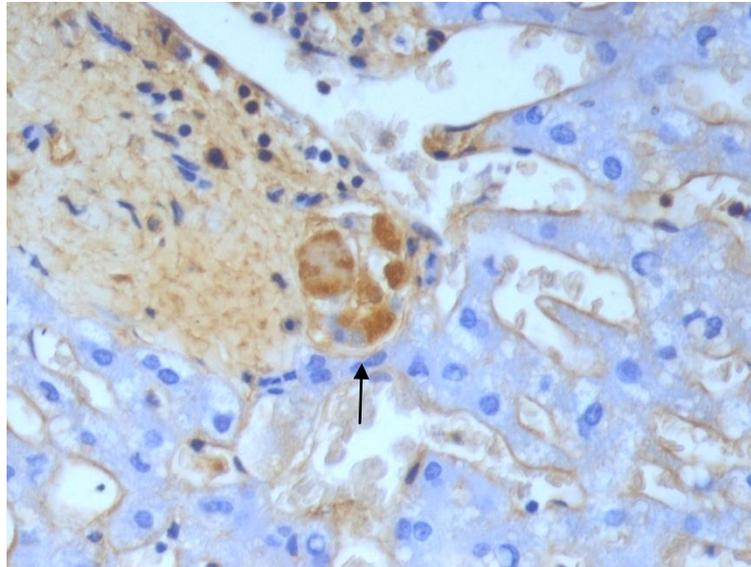
**Figura 5** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Linfonodo Mesentérico. Observam-se macrófagos espumosos isolados em centros foliculares (seta). HE, Obj. 40x.



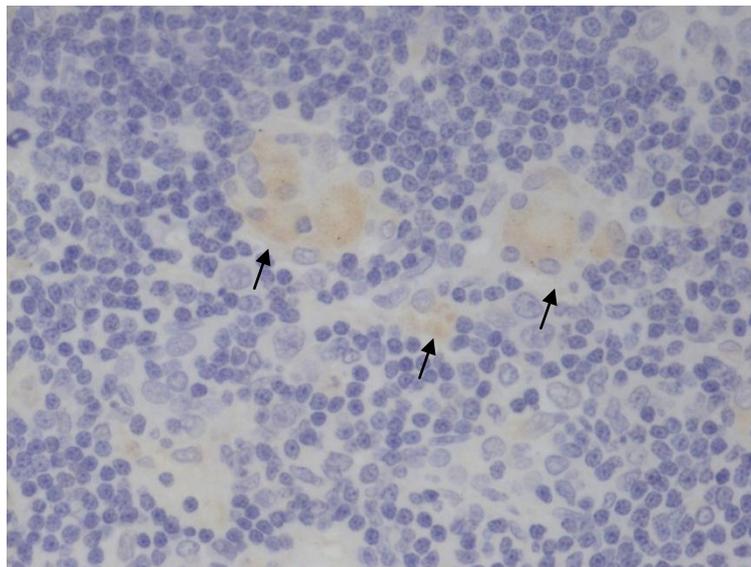
**Figura 6** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Fígado. Acentuada marcação para Succinyl-WGA (sWGA) em grupos de macrófagos espumosos (seta). Lectina-histoquímica, Obj. 40x.



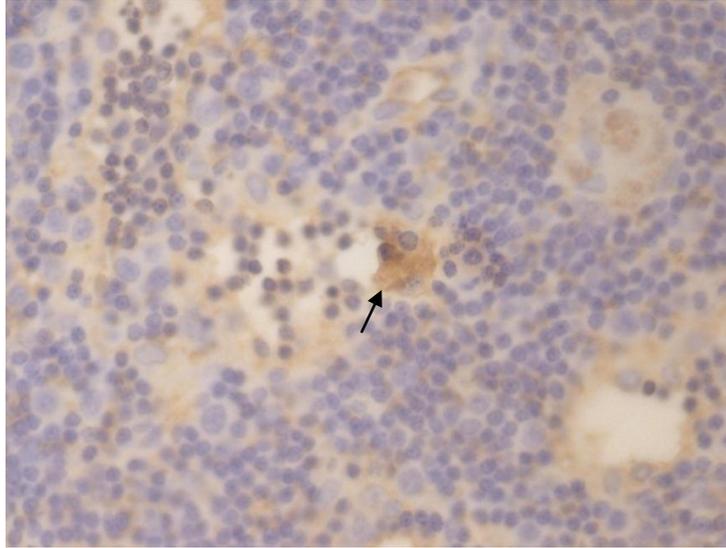
**Figura 7** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Fígado. Acentuada marcação para *Ricinus communis* (RCA-I) em macrófagos espumosos isolados (setas). Lectina-histoquímica, Obj. 40x.



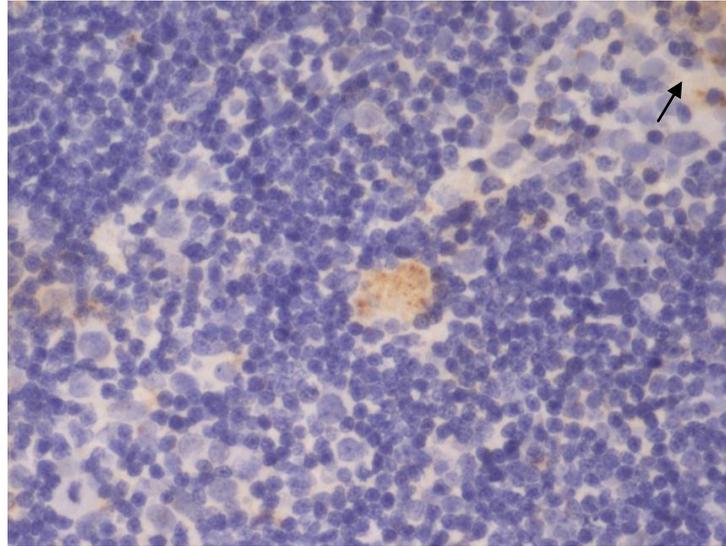
**Figura 8** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Fígado. Acentuada marcação para *Triticum vulgaris* (WGA) em grupos de macrófagos espumosos (seta). Lectina-histoquímica, Obj. 40x.



**Figura 9** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Linfonodo Mesentérico. Marcação leve para Succinyl-WGA (sWGA) em macrófagos espumosos isolados em folículos linfóides (setas). Lectina-histoquímica, Obj. 40x.



**Figura 10** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Linfonodo Mesentérico. Marcação leve para *Ricinus communis* (RCA-I) em macrófagos espumosos isolados em folículos linfóides (seta). Lectina-histoquímica, Obj. 40x.



**Figura 11** - Coelho intoxicado experimentalmente por *Brachiaria decumbens*, Linfonodo Mesentérico. Marcação leve para *Triticum vulgaris*(WGA) em macrófagos espumosos isolados em folículos linfóides (seta). Lectina-histoquímica, Obj. 40x.

**Agradecimentos** - Os autores agradecem ao aluno de doutorado Wanderley Bittencourt, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, pela identificação e classificação da planta. Os autores gostariam de agradecer à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica e pós-graduação e suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, G.M.L. et al. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

BARBOSA, J. D. et al. Fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n. 3, p. 147-153, 2006.

BOABAID, F. M. et al. Lectin histochemistry on sections of liver and hepatic lymph nodes from sheep grazing on *Brachiaria* spp. In: RIET-CORREA F. et al. (Ed.). **Poysoning plants, mycotoxins and related toxins**. London: CAB International, 2011. p. 124-128.

BRUM, K. B. et al. Crystal-associated cholangyopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2007.

COSTA, S. Z. R et al. Avaliação lectino-histoquímica de fígado e rim de ovinos com fotossensibilização causada por *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 8, p. 955-962, 2013.

DRIEMEIER, D. et al. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 29-341, 1998.

DRIEMEIER, D. et al. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.19, n.2, p.79-83, 1999.

DRIEMEIER, D. et al. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. **Toxicon**, Elmsford, v. 40, p. 1027-1031, 2002.

FACCIN, T. C. et al. Evaluation of the toxicity of *Brachiaria decumbens* in rabbits. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 143-146, 2016.

LEMOS, R. A. A. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 109-113, 1996.

LEMOS, R. A. A.; SALVADOR, S. C.; NAKAZATO, L. Photosensitization and crystal associated cholangio hepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 39, p. 376-377, 1997.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

MENDONÇA, F. S. et al. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Graminae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1034-1041, 2008.

MIRANDA, I. C. et al. Avaliação lectino-histoquímica de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 9, p. 798-804, 2016.

MUSTAFA, V. S. et al. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 1272-1280, 2012.

RIET-CORREA, B. et al. Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n. 9, p. 705-711, 2010.

RIET-CORREA, B. et al. *Brachiaria* spp. Poisoning of ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 3, p. 183-192, 2011.

SANTOS JÚNIOR, H. L. **Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos.** 2008. 65 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2008.

SOUZA, R. I. C. et al. Achados incidentais em fígados de coelhos alimentados com *Brachiaria decumbens*. In: ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 7., 2012, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRS, 2012. p. 115.

THOMPSON, K.G. et al. Sporodesmin toxicity in rabbits: biochemical and morphological changes. **Journal Comparative Pathology**, Bristol, v. 93, p. 319-329, 1983.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção.** 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. p. 323-335.