

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS ESPUMOSAS NO FÍGADO,
LINFONODOS MESENTÉRICOS E INTESTINO DE BOVINOS
ASSOCIADOS AO CONSUMO DE *Brachiaria* spp.**

**MARÍA SOLEDAD GOMAR
ORIENTADOR: DAVID DRIEMEIER**

**PORTO ALEGRE
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS ESPUMOSAS NO FÍGADO,
LINFONODOS MESENTÉRICOS E INTESTINO DE BOVINOS
ASSOCIADOS AO CONSUMO DE *Brachiaria* spp.**

MARÍA SOLEDAD GOMAR

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Patologia Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do (RS).

Orientador: David Driemeier

**PORTO ALEGRE
2002**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado e não estejam mencionados especificamente nesta lista. Agradeço atenciosamente aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária - UFRGS. Aos colegas e amigos da UFRGS, principalmente do setor de Patologia, pelo calor humano e ajuda incondicional do pessoal. Fundamentalmente a David Driemeier, pela excelente orientação, dedicação e mostrando ser admirável pessoa além de orientador. Aos professores da Universidade de La Plata, Eduardo J. Gimeno, Enrique L. Portiansky, Claudio Barbeito e Alberto Catalano, e às técnicas Rosa V. de Guidi e Laura Paoli. E fundamentalmente tudo isto com o apoio constante de meus afetos: meu amor Hernan J. Marchiselli; meus pais: Luis A. Gomar e Gloria F. M. de Gomar, responsáveis diretos pela minha educação, meus irmãos, na escrita da tese, e meus amigos, com a menção especial de Cris Cattani. Cláudio Cruz, Edson Moleta Colodel e Sandra Traverso.

Ihle dedico con muito amor a meu esposo Hernan e nosso filho Franco.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	4
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1. Generalidades.....	11
2.2. <i>Brachiaria</i> spp.....	12
2.2.1. Dados botânicos e biológicos.....	12
2.2.2. Princípio tóxico.....	12
2.2.3. Dados históricos e epidemiológicos.....	13
2.3. Alterações causadas por <i>Brachiaria</i> spp.....	19
2.3.1. Patogenia.....	19
2.3.2. Sinais clínicos	23
2.3.3. Achados macroscópicos.....	25
2.3.4. Achados microscópicos	27
2.3.5. Achados ultra-estruturais	29

2.3.6. Diagnóstico	29
2.3.7. Tratamento	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Coleta do material e técnicas histoquímicas	32
3.2. Lectinoistoquímica	32
3.3. Imunoistoquímica	33
4. RESULTADOS	35
4.1. Achados macroscópicos	35
4.2. Achados histológicos	36
4.3. Técnicas histoquímicas	39
4.4. Lectinoistoquímica	39
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ABSTRACT	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Principais carboidratos presentes nos vegetais.....	31
Tabela 2. Origem das lectinas biotilinas utilizadas, suas respectivas abreviaturas e relação de carboidratos que são marcados.....	33
Tabela 3. Achados histológicos no fígado.....	38
Tabela 4. Achados histológicos no linfonodo.	38
Tabela 5. Achados histológicos no intestino delgado.....	39
Tabela 6. Intensidade dos sítios de união das lectinas no fígado e no linfonodos dos animais alimentados com <i>Brachiaria sp.</i> e dos normais.....	41
Tabela 7. Intensidade dos sítios de união das lectinas no fígado e no linfonodos dos animais alimentados com <i>Brachiaria sp.</i> e dos normais.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fígados fixados em formalina a 10% comparação de um fígado normal (esquerda) em relação ao fígado de animal alimentado por *Brachiaria* sp. (direita) de cor amarelada..... 35
- Figura 2. Superfície de corte dos linfonodos hepático e mesentérico de um mesmo animal alimentado com *Brachiaria* sp. após fixação em formalina. Observa-se presença de estrias esbranquiçadas na cortical do linfonodo hepático (Setas) em relação ao linfonodo mesentérico. 36
- Figura 3. Corte histológico de fígado apresentando infiltração multifocal de macrófagos espumosos Obj. 10 HE..... 37
- Figura 4. Corte histológico linfonodo hepático apresentando infiltração de macrófagos espumosos entre dois centros foliculares (F) da cortical de forma linear Obj 10 HE. 37
- Figura 5. Duodeno, infiltrado de macrófagos espumosos na submucosa. Obj. 10. HE. 38
- Figura 6. Lectinoistoquímica PNA identificando os macrófagos espumosos no fígado Obj. 20. 40
- Figura 7. Lectinoistoquímica PNA evidenciando macrófagos espumosos no linfonodo mesentérico Obj. 10. 40
- Figura 8. Imunoistoquímica anti-monócitos de bovinos (anticorpo Mac 387) Material controle paratuberculose bovina com marcação de macrófagos epitelióides na mucosa do intestino Obj. 10..... 43

RESUMO

Características das células espumosas no fígado, linfonodos mesentéricos e intestino de bovinos associados ao consumo de *Brachiaria* spp.

Autor: María Soledad Gomar

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier.

Foram estudados fragmentos dos fígados, linfonodos hepáticos e mesentéricos, bem como dos intestinos de 100 bovinos machos, castrados, entre 3 e 4 anos de idade, da raça Nelore e provenientes do estado de Mato Grosso, onde eram mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens* e/ou *Brachiaria brizantha*. Macroscopicamente, os fígados apresentavam coloração amarela que se mantinha mesmo após a fixação em formalina, o que não foi constatado nos animais alimentados com outros pastos. O parênquima dos linfonodos apresentava áreas esbranquiçadas em forma de estrias paralelas, especialmente intensas nos linfonodos hepáticos.

As alterações histológicas incluíram tumefação de hepatócitos, colangite mononuclear, áreas com proliferação de ductos e a presença de macrófagos espumosos de distribuição multifocal no fígado, nos linfonodos mesentéricos e hepáticos e na submucosa do intestino.

Os tecidos com células espumosas foram submetidos a estudos histoquímicos, lectinoistoquímicos e imunoistoquímicos com o objetivo de caracterizar o conteúdo destas células. Através da Coloração de Perls, constatou-se as células espumosas com citoplasma corados de azul-claro, especialmente nos linfonodos e evidenciando a presença de depósitos de sais férricos, possivelmente em consequência da fagocitose de eritrócitos extravasados.

Na imunoistoquímica, o anticorpo Mac 387, marcador de macrófagos, não marcou as células espumosas. Na lectinoistoquímica, observou-se que a lectina PNA atuou como marcador devido às altas afinidade e especificidade de união com as células espumosas. Com esta lectina, observaram-se células espumosas isoladas, as quais não

eram vistas através de outras colorações. Além disto, em estudos feitos em humanos e em nossos animais, a PNA demonstrou ser específica para macrófagos, o que reforça a hipótese de que as células espumosas sejam macrófagos.

A comparação do padrão de afinidade das lectinas entre os animais alimentados e os não alimentados com *Brachiaria* sp., demonstrou que há alterações na composição de glicídios nos animais alimentados por *Brachiaria* spp.

1. INTRODUÇÃO

A *Brachiaria* spp. é uma forrageira de grande importância para alimentação de bovinos e ovinos, especialmente, na América Latina, África e Ásia. No Brasil, mais de 26 milhões de hectares destas pastagens estão distribuídos entre as regiões Centro-Oeste e Sudeste (HUTTON, 1975; DÖBEREINER et al., 1976; BABER, 1989). Dentre as qualidades da forrageira, destaca-se o fácil cultivo, a boa capacidade de produção de massa verde e de sementes (PARRAS & VIVAS, 1974) e a alta tolerância a solos ácidos e pouco férteis (PAULINO et al., 1987; RAO et al., 1993). No entanto, surtos esporádicos de fotossensibilização hepatógena têm ocorrido em animais alimentados com esta gramínea (DOBEREINER et al., 1976; OPASINA, 1985; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1997). Em 1975, quando os primeiros surtos foram observados no Brasil (HUTTON, 1975), considerava-se o fungo *Pithomyces chartarum*, produtor de uma micotoxina denominada esporidesmina, o agente etiológico (CAMARGO et al., 1976; DÖBEREINER et al., 1976; NAZÁRIO et al., 1977; TEMPERINI & BARROS, 1977; FAGLIARI et al., 1983, 1985 e 1993a; PURCHIO et al., 1988; ALESSI et al., 1994). Subseqüentemente, ficou demonstrado que os esporos do fungo nem sempre se encontravam em quantidade suficiente para serem considerados tóxicos (LEMOS et al., 1996a e b; MEAGHER et al., 1996; LEMOS et al., 1997) ou, até mesmo, estavam ausentes (OPASINA, 1985; LEMOS et al., 1998). Além disso, as cepas de *Pithomyces chartarum* do Brasil não eram constantemente produtoras da toxina esporidesmina (BREWER et al., 1989). Também foram encontradas diferenças entre as lesões produzidas por *Brachiaria* e aquelas produzidas pela micotoxina (DONE et al., 1960; MORTIMER et al., 1963; KELLERMAN & COETZER, 1985). A principal lesão observada nos casos em que a contagem de esporos foi baixa consistia na presença de cristais depositados no sistema biliar dos animais intoxicados (GRAYDON et al., 1991).

A identificação de saponinas esteroidais (MEAGHER et al., 1996) em *Brachiaria decumbens* tornou possível associar as plantas do gênero *Brachiaria* com um grupo de plantas produtoras de fotossensibilização que inclui *Tribulus terrestris*, *Agave lecheguilla*, *Panicum* spp., *Nartheccium ossifragum*, e *Nolina texana*. Todas,

exceto a última, possuem saponinas esteroidais na sua composição (MILES et al., 1993; CAMP et al., 1988; PATAMALAI et al., 1990; XU et al., 2000; KOSTOVA et al., 2000). Alguns autores acreditam que as saponinas causam a doença, por si só (MATHEWS, 1937; ABDELKADER et al., 1984; LANCASTER et al., 1991), entretanto, outros discutem a possibilidade de não serem a única causa das lesões (FLAOYEN et al., 1991 e 1993). Tem sido demonstrado que, quando metabolizadas pelos ruminantes, as saponinas formam cristais (MILES et al., 1994; MEAGHER et al., 1996) que podem ser vistos no sistema biliar.

Entre os achados histopatológicos da intoxicação por *Brachiaria* que não têm sido encontrados nas intoxicações pelas outras plantas deste mesmo grupo, destaca-se a presença de células com características morfológicas interessantes no fígado, linfonodos mesentéricos e hepáticos, intestino e baço. Estas células têm o citoplasma espumoso e núcleo periférico, muitas são multinucleadas e freqüentemente estão em acúmulos multifocais. O aparecimento destas células espumosas, principalmente encontradas nos fígados de bovinos coletados a partir de 1976, coincide com o período de introdução e formação de grandes áreas de pastagens com *Brachiaria* sp. no Brasil (DRIEMEIER et al., 1998).

Através da microscopia eletrônica, imagens negativas de contornos semelhantes a cristais, às vezes revestidas por membranas e semelhantes às dos fagolisossomos foram observadas no citoplasma dessas células espumosas. A identidade dessas células não foi, definitivamente, confirmada, mas suas características indicam tratar-se de macrófagos. Sabe-se que tais células não se coram pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e que são Oil red negativas, ou fracamente positivas e, quando isoladas, são de difícil visualização através das técnicas convencionais de HE (DRIEMEIER et al., 1998). Células espumosas (“foam cells”) têm sido encontradas em diferentes órgãos e doenças (WATANABE et al., 1982; SATTI et al., 1990), entretanto, as mais conhecidas são aquelas observadas na arteriosclerose (IULANO, 2001).

Este estudo tem por objetivo encontrar uma técnica que permita melhor visualização e identificação destas células, bem como determinar sua composição química. Neste sentido e utilizando-se as técnicas de histoquímica de lectinas e imunoistoquímica, pretende-se auxiliar na compressão da etiopatogenia e no diagnóstico da doença causada por *Brachiaria decumbens* bem como pelas outras plantas relacionadas, anteriormente mencionadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades

Tóxico é a substância que afeta a saúde quando inalada, ingerida ou absorvida em função de suas propriedades inerentes (GARNER, 1970). Dependendo da dose, qualquer substância pode ser tóxica (GOODMAN et al., 1991). Planta tóxica de interesse pecuário é aquela que quando ingerida pelos animais domésticos de fazenda, sob condições naturais, causa dano à saúde ou mesmo a morte (TOKARNIA et al., 2000).

Para provocar efeitos nocivos, as plantas tóxicas têm de ser ingeridas em quantidades suficientes e relacionadas com o peso do animal. De acordo com sua ação, as plantas tóxicas podem ser divididas em dois grandes grupos: o de plantas com ação direta e com ação remota. A grande maioria tem ação remota, isto é, o princípio tóxico não afeta o tubo digestivo. As de ação direta que exercem efeito sobre o tubo digestivo constituem a minoria.

Nem todas as plantas causam efeitos nocivos. Por exemplo, tem sido estudada a utilização das plantas fototóxicas no tratamento do câncer. Esta “terapia fotodinâmica” envolve a participação de um agente fotossensibilizante encontrado nas plantas *Hypericum perforatum* (Erva de São-João) e que causa apoptose e necrose das células tumorais sob efeito da luz (AGOSTINIS et al., 2002). Esta mesma planta também é tóxica contra alguns vírus (MISKOVSKY, 2002). Outro exemplo recente, se refere às plantas que contêm furocumarinas, sendo usadas juntamente com sistemas de radiação UV no tratamento de psoríases, micoses, câncer de pele não melanômicos e outras 16 doenças de pele (PATHAK & FITZPATRICK, 1992).

Os princípios tóxicos podem ser diversas substâncias. Vários fatores influenciam a toxidez de uma planta, podendo estar associados à planta e incluírem fase de desenvolvimento, partes tóxicas determinadas, forma de armazenamento, tipo de solo e procedência. Dentre os fatores associados aos animais, cita-se espécie, idade, pigmentação, exercício, ingestão de água, tolerância, imunidade e resistência individual.

Finalmente, há os fatores associados ao ambiente ou às condições gerais sob as quais ocorrem as intoxicações tais como fome, vício, estreita associação com outras plantas e transferência de animais. Para facilitar o estudo das plantas tóxicas, estas têm sido divididas em áreas de ocorrência, tipo característico de quadro clínico patológico desenvolvido, famílias botânicas e princípios tóxicos (TOKARNIA et al., 2000).

2.2. *Brachiaria* spp.

2.2.1. Dados botânicos e biológicos

Brachiaria spp. São plantas de regiões tropicais, principalmente africanas, pertencentes à família Gramineae, e que abrangem cerca de 80 espécies. A *Brachiaria decumbens* é perene, rizomatosa, suas folhas apresentam bainha e lâmina hirsutas, lineares e lanceoladas de oito até 23 cm de comprimento e 1,2 cm de largura. Inflorescência em ráculos, de 2 a 4. Espiguetas de 5 mm de comprimento, apresentando a gluma I com altura de 2 mm e largura de 3,5mm e a gluma II com pêlos esparsos, os quais também aparecem no lema estéril. Sua indicação é feita para as regiões úmidas que possuam um período seco de quatro a cinco meses (MONTEIRO et al., 1974). Diferentemente da maioria das forrageiras cultivadas para alimentação do gado, esta é muito resistente a altos níveis de alumínio e adaptada aos solos ácidos e inférteis (PAULINO et al., 1987; RAO et al., 1993).

A *Brachiaria brizantha* é perene, cespitosa e rizomatosa. Colmos finos, eretos, geralmente com 80 a 100 cm. de altura. Folha com a bainha hirsuta, língula ciliada de 0,15 cm. de comprimento; lâmina linear com 25 cm de comprimento e 0,15 cm de largura, subglabra ou pilósula (pilosidade percebida somente ao microscópio). Inflorescência em ráculos, geralmente solitários ou podendo apresentar até cinco. Ráculos de 4 a 12 cm, ráquis fino com as margens pilosas, espiguetas de 0,4 cm de comprimento. É considerada boa forrageira para regiões tropicais úmidas, podendo resistir a certas condições de pouca umidade. Sua propagação é feita por sementes, podendo ser efetuada através de rizomas (MONTEIRO et al., 1974).

2.2.2. Princípio tóxico

As substâncias tóxicas presentes em *Brachiaria* spp. são as saponinas esteroidais (MEAGHER et al., 1996), metabólitos secundários constituídos de carboidratos hidratados de carbono e que compõem várias espécies de plantas (PRICE et al., 1987; JOHNSON

et al., 1986, DINAN et al., 2001). Seu conteúdo é influenciado por fatores ambientais e seguem um ciclo sazonal, sendo mais concentrado em meados do verão (CHEEKE, 1995). Quimicamente, são glicosídeos esteroidais com núcleo espirostanólico, propriedades hemolíticas e que formam espuma abundante e estável, quando suas soluções aquosas são agitadas (HOSTETTMAN & MARSTON, 1995). Algumas têm diversas atividades biológicas, podendo ser citotóxicas (HU et al., 1999; MIMAKI et al., 2001), apoptóticas (CANDRA et al., 2001) e antiproliferativas (TRAN et al., 2001), podendo ser usadas contra neoplasias ou com atividade antiinflamatória (BERNEJO, 2000), antimicótica (ALVAREZ et al., 2001) e como precursoras de muitos medicamentos esteróides tais como diuréticos e hormônios sexuais (HOSTETTMANN & MARSTON, 1995).

2.2.3. Dados históricos e epidemiológicos

2.2.3.1. *Brachiaria* spp. no Brasil

A partir do momento que as gramíneas *Melinis multiflora*, *Hyparrhenia rufa*, e *Panicum maximum*, as quais predominavam no Brasil desde a época da escravidão, começaram a apresentar queda de produtividade devido ao esgotamento do solo, as gramíneas do gênero *Brachiaria* foram introduzidas no país. Adaptaram-se muito bem, pois são resistentes ao pisoteio de animais, à seca, aos solos ácidos e pouco férteis, se alastram pelo solo com rapidez impedindo o surgimento de plantas invasoras e evitando a erosão (PARRA & VIVAS, 1974; VIVAS & PARRAS, 1975; BABER, 1989). Em consequência de sua competitividade, têm se tornado as espécies predominantes onde são semeadas (LOW et al., 1993). Atualmente, estas pastagens são fonte alimentar para ruminantes e ocupam milhares de hectares nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (HUTTON, 1975; NOBRE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1978).

A *Brachiaria brizantha* é nativa da África tropical e foi introduzida na Seção de Nutrição e Agrostologia (S.N.A.) do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul em 1954, proveniente da Austrália (MONTEIRO et al., 1974). A *Brachiaria decumbens* foi introduzida pela primeira vez no Brasil em 1952, pelo Instituto de Pesquisa Experimental Agropecuária do Norte (IPEAN). O seu plantio geralmente é feito por estolhos, limitação esta que foi contornada a partir de 1972 pela importação de sementes com alto poder germinativo e provenientes da Austrália (NOBRE & ANDRADE, 1976). O Brasil passou a ter duas variedades de *Brachiaria decumbens*;

uma que se reproduz por estolhos, cujas sementes não tem bom poder germinativo (*B. decumbens* variedade IPEAN) e outra que se reproduz por sementeira (*B. decumbens* variedade australiana) com alto poder germinativo (NOBRE & ANDRADE, 1976).

Surtos de fotossensibilização começaram a aparecer dois anos após a introdução da variedade australiana e têm envolvido principalmente esta variedade. Hutton (1975) observou os primeiros casos que ocorreram em gado Nelore durante a estação seca de 1975 na região de Rio Verde, Goiás (DÖBEREINER et al., 1976). A partir desse ano, no Brasil, foram constatados novos casos esporádicos em bovinos (DÖBEREINER et al., 1976; NOBRE & ANDRADE, 1976; FAGLIARI et al., 1985), ovinos (DÖBEREINER et al., 1976; OPASINA, 1985; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b), caprinos (OPASINA, 1985; MEAGHER et al., 1996; LEMOS et al., 1998) e eqüinos (SCHENK & SCHENK, 1981). No Brasil, a ocorrência de fotossensibilizações também foi verificada envolvendo pastagens de *B. humidicola* em bovinos (DÖBEREINER, 1985) e ovinos (DÖBEREINER et al., 1976; NAZÁRIO et al., 1985; PURCHIO et al., 1988), de *B. ruziziensis* em bovinos (DÖBEREINER et al., 1976; NAZÁRIO et al., 1985; PURCHIO et al., 1988) e de *B. brizantha* em bovinos (NOBRE & ANDRADE, 1976; LEMOS et al., 1997).

2.2.3.2. *Brachiaria* spp. no mundo

Na América do Sul, foi registrada a ocorrência de fotossensibilização envolvendo *B. decumbens* na Venezuela (CIAT, 1984) e na Colômbia em bovinos (BARRERA & OCHOA, 1977). Em outros países, também se observaram surtos similares em *B. decumbens*: na Indonésia em ovinos (GRAYDON et al., 1991), na Nigéria em ovinos e caprinos (OPASINA, 1985), na Malásia em ovinos e caprinos (MAZNI et al., 1985; ZAMRI-SAAD et al., 1987) e na Austrália em bovinos (HUTTON, 1975).

2.2.3.3. *Brachiaria* spp. e *Pithomyces chartarum*

Casos de fotossensibilizações em ruminantes eram, usualmente, associados à presença do fungo *Pithomyces chartarum* em pastagens de *Brachiaria* (NAZÁRIO et al., 1975; ANDRADE et al., 1978; AMARAL et al., 1976) bem como em outras pastagens na Austrália (HORE, 1960), África do Sul (MARASAS et al., 1972), Estados Unidos (MONLUX et al., 1963; GLENN et al., 1965; TABER et al., 1968), Argentina (CARRILLO et al., 1980), Uruguai (RIET ALVARIZA et al., 1974; RIET ALVARIZA et al., 1977) e França (BEZILLE et al., 1984). Durante muito tempo diferentes trabalhos

estiveram a favor desta hipótese (CAMARGO et al., 1976; DOBEREINER et al., 1976; NAZÁRIO, et al., 1977; ANDRADE et al., 1978; FAGLIARI et al., 1983, 1985, 1993a, b, c; ALESSI et al., 1994; FAGLIARI et al., 1994a, b).

A reprodução experimental da intoxicação seguida de fotossensibilização foi descrita em coelhos inoculados com extratos de culturas do fungo (NAZÁRIO et al., 1977). Revisões sobre a doença no Brasil (CINTRA et al., 1977) incluindo aspectos químicos, físicos e biológicos da fotossensibilização (TEMPERINI & BARROS, 1977) foram apresentadas. A intoxicação foi reproduzida experimentalmente na espécie bovina, em pastagens de *B. decumbens* (ANDRADE et al, 1978) e foi relatada a incidência de fotossensibilização em bezerros submetidos a diferentes sistemas de manejo (SCHENK & SCHENK, 1981). Os fatores predisponentes na ocorrência de fotossensibilização em bovinos foram descritos (CAMARGO et al., 1976; ANDRADE et al., 1978). As plantas hospedeiras e a distribuição geográfica do *P. chartarum* foram estudadas (MALAVOLTA et al., 1980). Outro grupo de pesquisadores estudou os aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos e profiláticos da doença (FAGLIARI et al. 1983, 1985), além de terem analisado os aspectos epidemiológicos da intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina (FAGLIARI et al 1993b). Este mesmo grupo ainda estudou as lesões hepáticas encontradas nos animais acometidos (ALESSI et al., 1994).

O *Pithomyces chartarum* é um fungo pertencente à família Dematiaceae. É cosmopolita e considerado saprófita em vegetais (NAZÁRIO et al., 1977). Através de seu metabolismo, produz uma toxina denominada esporidesmina, responsável por manifestações clínicas de "eczema facial" em bovinos e ovinos (CLARE, 1955) e em eqüinos (McCARTHY, 1960; WHILLIAMS et al., 1990). A primeira constatação do fungo no Brasil foi feita em fins do ano 1975 por pesquisadores das Seções de Doenças Carenciais e Metabólicas e de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo (NAZÁRIO et al., 1975). A doença denominada "eczema facial" foi descrita inicialmente na Nova Zelândia, onde afetava predominantemente ovinos e bovinos em pastagens de *Lolium perrene* (CUNNIGHAM et al., 1942; CLARE, 1955; DONE et al., 1960; WEISS, 1962; MORTIMER et al., 1978).

2.2.3.4. *Brachiaria* spp. e as saponinas esteroidais

Para diagnosticar a doença, a estreita associação entre a produção de esporidesmina e a esporulação permitiu usar a contagem de esporos como um indicador da toxicidade de uma pastagem (MENNA et al., 1970), onde um nível de 100.000 esporos/g de pastagem é considerado perigoso (MENNA, 1973). A presença de espécies toxigênicas do fungo na alimentação não é prova suficiente da presença da micotoxicose (PIER, 1973). É necessário demonstrar tanto a presença de concentrações apreciáveis da toxina no alimento como a existência, nos animais, de quadros clínicos e patológicos típicos e, quando possível, demonstrar também a presença destes compostos ou de seus resíduos em tecidos e fluidos biológicos (TEMPERINI & BARROS, 1977), além de considerar a ausência de exposição a outros agentes tóxicos (HENSEN et al., 1994).

Considerando estes parâmetros diagnósticos ao examinar as pastagens de *B. decumbens*, surgiram dados contraditórios. Registravam-se casos da enfermidade em pastagens com altos níveis de esporos (FAGLIARI et al., 1993a); baixos níveis de esporos (LEMOS et al., 1996a e b; MEAGHER et al., 1996; LEMOS et al., 1997), ou até mesmo na ausência de esporos (OPASINA, 1985; BABER, 1989; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1998). Em outro trabalho encontrou-se o fungo, mas não se verificou a presença de esporos (NOBRE & ANDRADE, 1976) e em outros não se realizou a contagem (FAGLIARI et al., 1985; NAZÁRIO et al., 1985). Em amostras de *P. chartarum* provenientes destas plantas, não se constatou produção de esporidesmina (MEAGHER et al., 1996; COLLIN et al., 1998). Além disto, nem todas as cepas do fungo são tóxicas, há diversas referências sobre a existência de cepas muito tóxicas, medianamente tóxicas ou não tóxicas (MENNA et al., 1970; MARASAS & KELLERMAN, 1978; KELLERMAN et al., 1980; HALDER et al., 1981). Somente na Nova Zelândia, tem sido demonstrado que os esporos de *P. chartarum* são quase sempre tóxicos (MORTIMER & TAYLOR, 1962; MENNA et al., 1970; FLAOYEN & SMITH, 1992) e que, na maioria dos outros países, a produção de esporidesmina ocorre apenas numa minoria de amostras de *P. chartarum* isoladas (BREWER et al., 1989). Especificamente na América do Sul, nenhuma das cepas, incluindo 32 do Brasil, produziu esporidesmina nos cultivos de laboratório (BREWER et al., 1989).

Em 1991, estudos na Indonésia demonstraram a presença de cristais no sistema biliar (GRAYDON et al., 1991) e nos hepáticos de ovinos alimentados em pastagens de *Brachiaria* que, então foi relacionada com um grupo de plantas que também causavam a

formação desses cristais e fotossensibilizações. Estas plantas incluíam *Tribulus terrestris* (puncture vine), cuja simultânea ingestão de esporidesmina estava associada com a doença denominada “geeldikkop” ou “cabeça amarela inchada” (KELLERMAN et al., 1980; GLASTONBURY et al., 1984; KELLERMAN & COETZER, 1985); *Panicum* sp. (kleingrass) na doença denominada “dikkor” ou “orelha inchada” (KELLERMAN & COETZER, 1985; BRIDGES et al., 1987; LANCASTER et al., 1991; HOLLAND et al., 1991; KELLY, 1993), *Agave lecheguilla* (lecheguilla) (CAMP et al., 1988) e *Nartheicum ossifragum* (bog asphodel) na doença denominada “alved” (MILES et al., 1993). Estes cristais foram associados as saponinas presentes em *A. lecheguilla* (MATHEWS, 1937) e, posteriormente, também em outras plantas (BRIDGES et al., 1987).

Em *B. decumbens* (signal grass), foram encontradas saponinas derivadas de iamogenina e diosgenina (MILES, 1993; SMITH & MILES, 1993; MEAGHER et al., 1996), bem como uma mistura destas duas (CRUZ et al., 2000). Metabólitos derivados destas saponinas foram encontrados no rúmen de um animal fotossensibilizado (ABDULLAH et al., 1992).

2.2.3.5. Incidência

Uma característica da epidemiologia da colangiopatia associada com cristais e que também ocorre com *B. decumbens* é que as plantas são tóxicas esporadicamente, havendo várias hipóteses para explicar tal apresentação. Variações do nível de saponinas presentes (MILES et al., 1993), podendo ser influenciadas por outros fatores como condições ambientais (NDAMBA et al., 1994). A existência de fatores que influenciam a absorção das saponinas no sistema digestivo (GRAYDON et al., 1991; LANCASTER et al., 1991). Estudos feitos em humanos, demonstraram diferenças entre indivíduos quanto ao metabolismo de fitoestrógenos na microflora do intestino (ROWLAND et al., 1999). Estas diferenças na microflora do intestino poderiam explicar diferenças individuais (MEAGHER et al., 2001). Ainda, a participação simultânea de um fungo como ocorre nas doenças “geeldikkop” ou “alved” (KELLERMAN et al., 1980; MILES et al., 1994) poderia, igualmente, explicar a ocorrência esporádica dos surtos.

Subseqüentemente, também no Brasil, se verificou a presença de cristais no sistema biliar de animais acometidos pela doença e expostos a *Brachiaria*: ovinos (LEMOS et al., 1996b), bovinos (LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 1997) e caprinos

(LEMOS et al., 1998). Em 1996, foram encontradas diosgenina e iamogenina nas amostras da forrageira brasileira (MEAGHER et al., 1996).

Em relação aos achados histológicos, a presença de células com citoplasma espumoso no fígado de bovinos coletados a partir de 1976 tem sido característica da doença, além de coincidir com a introdução e difusão das pastagens de *Brachiaria* spp no Brasil (DRIEMEIER et al., 1999). Estas lesões foram reproduzidas em ovinos pastando *B. decumbens* com níveis extremamente baixos de esporos de *P. chartarum* (CRUZ et al., 2000), e também por administração dos extratos da planta (CRUZ et al., 2001). A esporidesmina tem sido referida como substância bastante instável (WHITE et al., 1977), sendo improvável que resista ao procedimento de extração de saponinas (SMITH & MILES, 1993).

2.2.3.6. Animais afetados

Os animais afetados no Brasil são especialmente bovinos jovens, desmamados e até os dois anos de idade (CAMARGO et al., 1976; NOBRE & ANDRADE, 1976; HUTTON, 1975; DOBEREINER, 1976; SCHENK & SCHENK, 1981; FAGLIARI et al., 1985) e ovinos jovens (DOBEREINER et al., 1976). Os caprinos são menos susceptíveis para alguns autores (OPASINA, 1985; GRAYDON et al., 1991), mas para outros não (LEMOS et al., 1998). Quanto a animais de experimentação: o extrato etanólico do líquido ruminal de uma ovelha intoxicada com *B. decumbens* causou aumento do fígado e necrose acentuada de hepatócitos severa em ratos (ABDULLAH et al., 1988); em cobaias, o tempo de vida foi menor nos intoxicados (ANDRADE et al., 1978).

A fotossensibilização foi descrita em terneiros na Austrália (HUTTON, 1975), em ovinos e caprinos na Malásia (MAZNI et al., 1985; ZAMRI-SAAD et al., 1987), em ovinos e caprinos na Nigéria (OPASINA, 1985) e em ovinos na Indonésia (GRAYDON et al., 1991). A taxa de prevalência variou em bovinos de 5 a 60 %, enquanto a taxa de mortalidade de zero a 90% (CAMARGO et al., 1976). Ovinos de qualquer idade têm sido afetados (DOBEREINER et al., 1976).

2.3. Alterações causadas por *Brachiaria* spp.

2.3.1. Patogenia

2.3.1.1. Fotossensibilização

A fotossensibilização é uma doença produzida pela sensibilidade das camadas superficiais da pele à luz, pela presença local de agentes fotodinâmicos, os quais apresentam uma configuração química que é capaz de absorver determinados comprimentos de onda de luz ultravioleta. Quando a pele, sensibilizada por esses agentes, é exposta à luminosidade intensa, ocorre dano celular afetando o núcleo, a membrana, os lisossomos e as mitocôndrias, desenvolvendo-se a dermatite, com liberação de histamina, morte celular local e edema tissular (RIET-CORREA et al., 1998).

2.3.1.1.1. Classificação

2.3.1.1.1.1. Quanto à origem do agente fotossensibilizante

(a) Primária ou do tipo I, quando desencadeada por compostos exógenos, originalmente presentes como tal no vegetal e que, passando pelo fígado sem lhe causar dano, atingem a circulação periférica e se depositam na pele (TEMPERINI & BARROS, 1977). É menos comum que a forma secundária (BABER, 1989). Como exemplos citam-se: plantas como *Hypericum perforatum* (“erva-de-São-João”), *Fagopyrum sagittatum* (“trigo mourisco”), *Fagopyrum esculentum* (“trigo sarraceno”) e *Ammi majus* (KELLERMAN & COETZER, 1985), a ingestão de folhas mofadas de *Cooperia pedunculata* e a administração de fenotiazina, tetraciclina, tiazidas e sulfonamidas (YAGER & SCOTT, 1993; PLUMLEE, 1995).

(b) Congênita ou do tipo II que ocorre devido à síntese defeituosa de pigmentos, síndrome também denominada porfiria, onde ocorre acúmulo de pigmentos endógenos devido a perturbações no metabolismo das porfirinas, ocasionando destruição de membranas lisossomais. São geralmente hereditárias e ocorrem devido a deficiências das enzimas que estão envolvidas na síntese do grupamento heme da hemoglobina. Neste item, inclui-se a porfiria eritropoética congênita ou doença do dente rosa, em bovinos (CLARE, 1955), humanos e presumivelmente gatos siameses.

(c) Hepatógena, secundária ou do tipo III, que surge como consequência de uma disfunção hepática provocada por constituintes hepatotóxicos presentes no vegetal. A

lesão pode se localizar, primeiramente, no parênquima ou no sistema biliar. Nas duas alternativas, o dano no fígado causa retenção de filoteritina (KELLERMAN & COETZER, 1985). Esta substância é um produto normal da degradação da clorofila no organismo e tem sido apontada como desencadeadora da reação fotossensibilizante, pois o fígado lesado não é capaz de retirá-la da circulação e metabolizá-la adequadamente (TEMPERINI & BARROS, 1977). Pode ser causada por varias plantas como *Lantana* spp., *Lippia* spp., *Asaemia axilaris*, *Kochia scoparia*, *Tetradymia* spp., *Athanasia trifurcata*, *Cynoglossum officinale*, *Amsinckia intermedia*, *Senecio* spp., *Echium plantagineum*, *Myoporum laetum*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Tribulus terrestris*, *Panicum* spp., *Nolina texana*, *Agave lecheguilla*, *Nartheceum ossifragum*, *Medicago* spp. (KELLERMAN & COETZER, 1985), por fungos *Phomopsis leptostromiformis* e *Pithomyces chartarum*, pela alga *Microcystis aeruginosa* (KELLERMAN & COETZER, 1985), por deficiência de cobalto, intoxicação por tetracloreto de carbono, infecção por *Leptospira* spp., e deficiências enzimáticas (KELLY, 1993).

(d) De origem não determinada, são casos esporádicos associados ao consumo de palhas e fenos molhados, de *Ranunculus bulbosus* ou *Polygonum* spp., ingestão de alfafa (HOUSE et al., 1996) e forragens verdes de aveia, trigo e trevo vermelho (CASTEEL et al., 1991; COLLÓN et al., 1996).

2.3.1.1.1.2. Quanto à fisiopatologia

(a) Fotoalergia é a resposta de hipersensibilidade retardada do tipo IV. Para ocorrer, requer uma fase de sensibilização e mínima concentração do fotoalérgeno. É menos comum que fototoxicidade (ALLEN, 1993).

(b) Fototoxicidade é o mecanismo que sucede com *Brachiaria* spp. Ocorre lesão direta de tecidos produzida por uma dose adequada de um agente fototóxico expostos à radiação apropriada, é mediada por formas de oxigênio reativas e mediadores inflamatórios. São vários os mecanismos que medeiam esta reação: (1) Formação de moléculas em estado de excitação que participam de processos fotodinâmicos dependentes do oxigênio causando a lesão citotóxica. Estas reações acontecem com as porfirinas, griseofulvina e antiinflamatórios não esteróides. (2) Algumas substâncias tais como tetraciclinas e clorpromazina, ao serem expostas à radiação, formam fotoprodutos estáveis que produzem lesão tissular. (3) A ligação do agente fotossensibilizador ao substrato biológico pode ser mediada pela radiação. (4) Os mediadores podem ser

substâncias inflamatórias tais como icosanóides, proteases e produtos biologicamente ativos oriundos de ativação de complemento (FITSPATRICK, 2001).

2.3.1.2. Fotossensibilização associada com cristais

2.3.1.2.1. Aspectos gerais

Em vários países, casos de fotossensibilização hepatógena têm sido associados com o consumo de plantas que contêm saponinas esteroidais (MATHEWS, 1937) tais como *Agave lecheguilla* (CAMP et al., 1988), *Panicum* spp. (BRIDGES et al., 1987; HOLLAND et al., 1991; PATAMALAI et al., 1990), *Tribulus terrestris* (KELLERMAN et al., 1991; MILES et al., 1994), *Nolina texana* (MILES et al., 1994) e *Nartheicum ossifragum* (MILES et al., 1993). Uma característica comum observada nestas doenças tem sido a presença de cristais nos hepatócitos, macrófagos, ductos biliares e bile (HOLLAND et al., 1991; MILES et al., 1993). Saponinas esteroidais têm sido identificadas quimicamente como sendo derivadas de esmilagenina em *Agave lecheguilla* (CAMP et al., 1988), de sarsapogenina e esmilagenina em *Nartheicum ossifragum* (MILES et al., 1993) e de diosgenina e iamogenina em *Panicum coloratum* e *P. miliaceum* (PATAMALAI et al., 1990). Em amostras de *Tribulus terrestris* obtidas de áreas onde ocorria “geeldikkop” havia níveis significativos de saponinas, entretanto onde a doença não ocorria, eram encontrados níveis menores de saponinas (HENRICA, 1952). Embora algumas de suas saponinas derivem da diosgenina, outras saponinas foram identificadas recentemente (KOSTOVA et al., 2000; XU et al., 2000). O mecanismo de toxicidade não se conhece completamente, mas as alterações histopatológicas produzidas por *Tribulus terrestris* são mais proeminentes no fígado e no rim e associadas com hemólise em grau variável (GLASTONBURY et al., 1984). Nas intoxicações por *Panicum* spp., também são descritas lesões do coração tais como necrose dos músculos papilares (BRIDGES et al., 1987).

Estas saponinas têm sido relacionadas com o depósito de material cristalóide porque também foram isoladas na bile. Estes cristais são sais insolúveis de cálcio de 5 β -espirostanóis-3 α -ol β -D-glicuronídeos derivados do metabolismo das saponinas das plantas, ou seja β -D-glicuronídeos de epismilagenina e episarsapogenina (MILES et al., 1994; MEAGHER et al., 1996). O metabolismo ruminal converte a diosgenina em β -D-glicuronídeo epismilagenina e a iamogenina em β -D-glicuronídeo episarsapogenina (MILES et al., 1994; MEAGHER et al., 1996). Esta transformação ocorre através de vários processos: hidrólise dos açúcares das saponinas da planta, redução da ligação

dupla do C5, epimerização do grupo hidroxila C3 e a conjugação do ácido glicurônico (MILES et al., 1994).

Em um estudo experimental com *N. ossifragum*, foram observadas três regiões metabólicas para as saponinas. No rúmen, as saponinas ingeridas são convertidas por hidrólise e redução. Duodeno, jejuno e íleo formam uma zona de absorção e secreção, onde há variações nas concentrações das saponinas livres e conjugadas. Especificamente no duodeno, estas substâncias são absorvidas (FLAOYEN & WILKINS, 1997) e transportadas, através da veia porta, ao fígado, onde acontece a conjugação das saponinas livres. No ceco e cólon, continuam com a epimerização e concentração. Não se detectaram saponinas livres ou conjugadas na urina (MEAGHER et al., 2001).

Alguns autores consideram que as saponinas causam, por si só, o problema (MATHEWS, 1937; ABDELKADER et al., 1984; LANCASTER et al., 1991;), mas outros discutem a possibilidade de não serem a única causa das lesões (FLAOYEN et al., 1991 e 1993). Uma hipótese sugere que a fotossensibilização hepatógena possa ser causada pelo bloqueio do fluxo da bile ocasionado pelo material cristalóide, provocando assim a retenção de filioeritrina (KELLERMAN et al., 1991; COETZER et al., 1983) como acontece em “geeldikkop”. Há evidência histológica a favor disto, pois os ductos biliares podem estar ocluídos por cristais e as lesões nos tratos portais são compatíveis com doença biliar oclusiva (COETZER et al., 1983). Adicionalmente, a fibrose lamelar periductal pode ser encontrada tanto em ovelhas com “geeldikkop” como em ovelhas onde os ductos biliares foram ligados cirurgicamente (COETZER et al., 1983). Ambos os casos podem resultar em fotossensibilização.

Outra teoria sugere que o dano no parênquima e nos ductos seria importante na retenção de filioeritrina (GRAYDON et al., 1991) como ocorre nas doenças “alved” (FLAOYEN et al., 1991) e “geeldikkop” (KELLERMAN et al., 1991). Finalmente, outra hipótese sugere que as toxinas atuam inicialmente nas membranas do canalículo biliar, de forma similar aos triterpenos pentacíclicos da *Lantana* (SMITH & MILES, 1993), levando em conta a ausência de lesões similares à intoxicação com esta última planta no “geeldikkop”. Nos casos envolvendo as plantas *P. dichotomiflorum* e *T. terrestris*, acredita-se ainda que haja contribuição de uma micotoxina esporidesmina exacerbando a fotossensibilização.

2.3.1.2.2. Fotossensibilização associada com *Brachiaria* spp.

As fotossensibilizações produzidas por *Brachiaria decumbens* no Brasil não são mais consideradas como sendo produzidas pelo fungo *P. chartarum*, como se acreditava até recentemente. Esta mudança de conceito ocorreu devido à impossibilidade de se obter a toxina esporidesmina da maioria dos isolados brasileiros do fungo (MEAGHER et al., 1996; COLLIN et al., 1998) e a várias descrições de surtos sem a presença dos esporos do fungo (NOORDIN et al., 1989; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996a; LEMOS et al., 1998). Além disso, a doença foi reproduzida experimentalmente em ovelhas pastoreadas em *B. decumbens* sem presença do fungo (CRUZ et al., 2000) e através da administração de extratos de *B. decumbens* obtida de pastagens com ausência de esporos (CRUZ et al., 2001).

Atualmente, considera-se que a planta pertença ao grupo de plantas que contêm saponinas esteroidais, mencionado anteriormente. Na *B. decumbens*, também se encontraram saponinas esteroidais, sendo a principal delas a diosgenina e em menor quantidade iamogenina e uma mistura de ambas (SMITH & MILES, 1993; CRUZ et al., 2000). Em animais que consumiram *B. decumbens*, foram identificados metabólitos derivados das saponinas tais como uma mistura de sapogeninas identificadas como 3-espirostanóis no rúmen (ABDULLAH et al., 1992) e de substâncias semelhantes a epismilagenina e a episarsapogenina na bile e nos cristais biliares (ABDULLAH et al., 1992; CRUZ et al., 2000). A natureza esporádica dos surtos poderia ser consequência de que a concentração de saponinas em *B. decumbens* varia entre vegetais maduros e jovens (MILES, 1993).

2.3.2. Sinais clínicos

2.3.2.1. Ovinos

Os sinais gerais que têm sido observados são depressão, apatia, anorexia, procura pela sombra (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b), além de emaciação (ABDULLAH et al., 1988). Lesões cutâneas, inicialmente, se caracterizam por edema da face (ABDULLAH et al., 1988; LEMOS et al., 1996b), seguido por dermatite acentuada (OPASINA, 1985; ABDULLAH et al., 1988; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b) e, posteriormente, formação de crostas na região dos olhos, focinho (LEMOS et al., 1996b; DRIEMEIER et al., 1998) e orelhas. Em alguns animais, as orelhas ficam caídas em função do edema, ou com seus bordos dobrados e enrugados

para cima devido à mumificação local (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b), ou ainda avermelhadas. O edema também atinge a cabeça, principalmente nas regiões facial e submandibular (ABDULLAH et al., 1988; GRAYDON et al., 1991). Icterícia moderada (OPASINA, 1985; ABDULLAH et al., 1988; GRAYDON et al., 1991; CRUZ et al., 2000), conjuntivite com corrimento ocular e cegueira (OPASINA, 1985; LEMOS et al., 1996a), estase ruminal (ABDULLAH et al., 1988), diarreia (CRUZ et al., 2001) têm sido registrados.

A alteração no crescimento e atividade dos microorganismos do rúmen, refletindo numa menor concentração de ácidos graxos foi constatada (ABDULLAH et al., 1992). Sintomas nervosos incluem incoordenação motora, andar em círculo (OPASINA, 1985; ABDULLAH et al., 1988; LEMOS et al., 1996b), tremor da cabeça, letargia (CRUZ et al., 2001), olhar fixo (LEMOS et al., 1996b), depressão, coma antes da morte (LEMOS et al., 1996b), ataxia e paralisia dos membros anteriores (OPASINA, 1985; ABDULLAH et al., 1988). A morte pode ocorrer após um período de um mês de pastoreio contínuo (ABDULLAH et al., 1988) ou 7-10 dias depois da aparição dos sinais clínicos (OPASINA, 1985; LEMOS et al., 1996a).

2.3.2.2. Bovinos

Estado nutricional regular (LOW et al., 1993), perda de peso (BARRERA & OCHOA, 1977; DÖBEREINER et al., 1976) de 1 a 2 quilos/dia (CIAT, 1984), procura por áreas de sombra, prurido acentuado, irritação e excitação com movimentos anormais de cabeça e orelhas, desidratação, morte entre 3 a 5 dias (NOBRE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1978; FAGLIARI et al., 1994a; LEMOS et al., 1998) foram todos registrados.

As partes cutâneas menos pigmentadas e menos protegidas por pêlos são as mais afetadas (TOKARNIA et al., 2000). As lesões cutâneas caracterizam-se por eritema, seguido por edema inflamatório com espessamento das partes afetadas, aparecendo exsudato seroso na superfície da pele e formação de crostas. Finalmente, ocorre necrose de pele e gangrena seca. Em casos leves, há somente uma descamação das partes superficiais e dermatite. Estas lesões acontecem principalmente no dorso (LEMOS et al., 1997), pescoço (BARRERA & OCHOA, 1977; LEMOS et al., 1997), flancos (LOW et al., 1993; LEMOS et al., 1997; HUTTON, 1975; FAGLIARI et al., 1983, ANDRADE et al., 1978; FAGLIARI et al., 1983 e 1985), períneo (LEMOS et al., 1997), região glútea, barbela (FAGLIARI et al., 1983), orelhas (HUTTON, 1975;

BARRERA & OCHOA, 1977; ANDRADE et al., 1978; FAGLIARI et al., 1983 e 1985; LEMOS et al., 1997) e inserção da cauda (LOW et al., 1993). Icterícia (OPASINA, 1985; LEMOS et al., 1998). Lesões cutâneas também têm sido encontradas em áreas do corpo protegidas da radiação solar, como a região interna dos membros e glândula mamária (FAGLIARI et al., 1985 e 1993b). Eritema e edema na região dos olhos, focinho e orelhas, as quais apresentavam também formação de vesículas coalescentes no pavilhão auditivo, lacrimejamento devido à ceratite bilateral (LEMOS et al., 1996 a e 1997), anorexia (BARRERA & OCHOA, 1977), diminuição dos movimentos do rúmen (LOW et al., 1993), diarreia pastosa (NOBRE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1978), inquietação com movimento anormal da cabeça e orelhas (NOBRE & ANDRADE, 1976), polidipsia, hemoglobinúria (FAGLIARI et al., 1985) e morte acometendo 25% ou mais dois animais afetados (FAGLIARI et al., 1993b) têm sido observados nestas intoxicações. Fagliari et al. (1993a) distinguiram três formas clínicas da doença: aguda, crônica moderada e crônica grave.

2.3.2.3. Caprinos

Lesões cutâneas e mucosas na região dos olhos, focinho e orelhas, bem como a presença de icterícia foram relatados em caprinos (OPASINA, 1985; LEMOS et al., 1998).

2.3.3. Achados macroscópicos

2.3.3.1. Ovinos

Estado nutricional regular (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996a), fotodermatite na região da cabeça (GRAYDON 1991; LEMOS et al., 1996a e 1997), edema subcutâneo com aspecto gelatinoso e coloração amarelada (GRAYDON et al., 1991), icterícia nos órgãos e tecidos (BARRERA & OCHOA, 1977; OPASINA, 1985; ABDULLAH et al., 1988; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b e 1997), subcutâneos, gordura omental e mesentérica, serosas e membranas mucosas (ABDULLAH et al., 1988) bem como perda de elasticidade da pele com desprendimento do pêlo (LEMOS et al., 1996a) têm sido as primeiras alterações identificadas na necropsia.

Fígado mais firme (ABDULLAH et al., 1988; LEMOS et al., 1996a), com coloração amarelada (DOBEREINER et al., 1988; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b, 1997, 1998), com áreas branco-amareladas de distribuição multifocal na

superfície do órgão (ABDULLAH et al., 1988; LEMOS et al., 1996a; CRUZ et al., 2000; DRIEMEIER et al., 2002), padrão lobular acentuado, espessamento discreto a moderado de ductos biliares (LEMOS et al., 1996a) e degeneração gordurosa do fígado (OPASINA, 1985) são os principais achados macroscópicos descritos. Rúmen com conteúdo reduzido (ABDULLAH et al., 1988), vesícula biliar ligeiramente distendida (ABDULLAH et al., 1988; LEMOS et al., 1996a) e com bile escura e espessa (GRAYDON et al., 1991), rins com coloração similar ao fígado (GRAYDON et al., 1991), aumentados de tamanho (ABDULLAH et al., 1988) também foram observados. Os linfonodos hepáticos e mesentéricos apresentam-se com tamanho normal e estriações esbranquiçadas, forma radiada na cortical e medular, com pequenas áreas brancas nodulares multifocais na medular e, muitas vezes, associadas com focos hemorrágicos (DRIEMEIER et al., 1998).

2.3.3.2. Bovinos

Lesões de pele e mucosas incluem fotodermatite (LEMOS et al., 1997), perda de elasticidade da pele com desprendimento do pêlo e formação de crostas (LEMOS et al., 1996a), icterícia (LEMOS et al., 1997; LOW et al., 1993), mucosas pálidas ou ictéricas (NOBRE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1978), ulcerações generalizadas na pele, desprendimento em algumas partes (NOBRE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1978), dobramento das pontas das orelhas e queda de pêlos (ANDRADE et al., 1978) têm sido descritos.

Fígado amarelo (LEMOS et al., 1997; DRIEMEIER et al., 1998), aumentado de volume (LOW et al., 1993), com bordos arredondados e em algumas áreas, aderidos ao intestino, de coloração esverdeada, com discreta evidência do padrão lobular (ANDRADE et al., 1978). Vesícula biliar distendida (LEMOS et al., 1997) e repleta (ANDRADE et al., 1978). Linfonodos hepáticos e mesentéricos com tamanho normal e outros de volume aumentado (NOBRE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1978), com estriações esbranquiçadas de forma radiada na cortical e medular, pequenas áreas brancas nodulares multifocais na medular, muitas vezes, associadas com focos hemorrágicos (DRIEMEIER et al., 1998). Rins castanhos escuros (LOW et al., 1993; LEMOS et al., 1997) Baço com moderado aumento de volume (ANDRADE et al., 1978; LEMOS et al., 1996a) Tireóide aumentada (NOBRE & ANDRADE, 1976) Pulmões com superfície apresentando áreas avermelhadas irregulares sem respeitar

lobulações (NOBRE & ANDRADE, 1976) Rúmen com conteúdo ressequido (NOBRE & ANDRADE, 1976) são os achados descritos nessa espécie.

2.3.3.3. Caprinos

Caprinos têm demonstrado relativa resistência à toxicidade (OPASINA, 1985; GRAYDON et al., 1991). Lesões cutâneas crostosas, corrimento nasal e ocular, eritema e edema na região dos olhos, focinho e orelhas, as quais apresentavam também a formação de vesículas coalescentes na região interna e crostas, discreta icterícia, fígado com aumento moderado de volume e discreto aumento de consistência e coloração moderadamente amarelada, vesícula biliar com acentuada distensão e rins castanho escuros (LEMOS et al., 1998) foram os achados descritos.

2.3.4. Achados microscópicos

As lesões predominantes ocorrem no fígado, rim e pele (GRAYDON et al., 1991). Dermatite com necrose difusa da epiderme e formação de crostas, hiperqueratose acompanhada por infiltrado inflamatório predominantemente neutrocitário na epiderme e derme (GRAYDON et al., 1991; CAMARGO et al., 1976; LEMOS et al., 1996a), bem como dermatomiose hemorrágica (CAMARGO et al., 1976) são descritos.

As lesões de fígado de um ovino sacrificado aos 77 dias de um experimento em *B. decumbens* não apresentaram diferenças significativas daquelas encontradas nos ovinos sacrificados aos 150 dias de consumo de *Brachiaria* spp. (CRUZ et al., 2000). A colangite ou colangio-hepatite seria a alteração mais freqüente (DOBEREINER et al 1976; ALESSI et al., 1994), podendo ser acompanhada de proliferação de ductos biliares (BARRERA & OCHOA, 1977; CRUZ et al., 2000, DRIEMEIER et al., 2002) e bilestase (LEMOS et al., 1996a).

Vacuolização citoplasmática de hepatócitos, megalocitose, colangite, proliferação de ductos biliares, proliferação conjuntiva, infiltrado celular inflamatório (ALESSI et al., 1994) e degeneração gordurosa intensa, mais acentuada na zona centrolobular (CAMARGO et al., 1976). Um achado predominante tem sido a tumefação hepatocelular (BARRERA & OCHOA, 1977; DRIEMEIER et al., 2002). Necrose individual de hepatócitos (ABDULLAH et al., 1988), mais acentuada na região centrolobular (FLAOYEN & SMITH, 1992), bem como numerosos hepatócitos apresentando cariomegalia (LEMOS et al., 1996a) foram encontrados. Intensa formação de células com o citoplasma espumoso e núcleos periféricos que freqüentemente se

agrupam e formam células multinucleadas, de distribuição aleatória (LEMOS et al., 1996a; DRIEMEIER et al., 1998) e células de Kupffer muito evidentes e numerosas (DOBEREINER et al., 1976), proliferação de tecido fibroso, acompanhada por proliferação de células do ducto biliar e infiltrado inflamatório mononuclear (LEMOS et al., 1996b; CRUZ et al., 2000) e, às vezes, também com linfócitos (CRUZ et al., 2000) têm sido achados microscópicos adicionais.

Cristais birrefringentes opticamente ativos têm sido vistos na luz dos ductos ou canalículos biliares (LEMOS et al., 1996b; CRUZ et al., 2000), os quais também apresentavam necrose de epitélio. Estas estruturas também são visualizadas nas células de Kupffer e nos hepatócitos (GRAYDON et al., 1991).

Linfonodos hepáticos e mesentéricos apresentam grande número de agrupamentos de células com citoplasma espumoso e células multinucleadas semelhantes às descritas no fígado (LEMOS et al., 1996a; DRIEMEIER et al., 1998), associadas com áreas de necrose e hemorragia.

No encéfalo foram observados vacúolos de diferentes tamanhos na substância branca, que conferiram ao órgão uma aparência esponjosa (ABDULLAH et al., 1988). Um grupo de pesquisadores observou nos rins tumefação e vacuolização do epitélio tubular, material eosinofílico amorfo nas células epiteliais, na luz tubular e nos espaços de Bowman (GRAYDON et al., 1991).

Estes mesmos pesquisadores encontraram diferenças entre as lesões de animais submetidos a 30 e 60 dias de pastoreio. No primeiro grupo, a reação inflamatória periductal predomina e as estruturas cristalóides encontram-se em canalículos, hepatócitos e células de Kupffer. Nos animais que pastorearam por 60 dias houve fibrose periductal e necrose focal do epitélio de alguns ductos, proliferação de ductos biliares e oclusão de muitos ductos por estruturas cristalóides. No rim constatou-se a presença de substância amorfa levemente eosinofílica nos espaços de Bowman e no lúmen dos túbulos (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b) e nefrose moderada (GRAYDON et al., 1991).

2.3.4.1. Células espumosas (“foam cells”)

O aparecimento dos macrófagos espumosos em fígados de bovinos coletados a partir de 1976 coincide com a introdução de pastagens de *Brachiaria* sp. no Brasil. Pela revisão do material de arquivo Laboratório de Anatomia Patológica da Embrapa-Saúde Animal, verifica-se que os macrófagos com citoplasma espumoso não estavam

presentes em bovinos que não ingeriram *Brachiaria* sp., o que indica a relação entre a sua presença e a ingestão da planta (DRIEMEIER et al., 1999). São achados tardios, pois são observados em animais que consumiram a planta por períodos de, pelo menos, 150 dias (DRIEMEIER et al., 1998; CRUZ et al., 2000; DRIEMEIER et al., 2002).

Estas células têm citoplasma espumoso, muitas são multinucleadas e estão irregularmente distribuídas em todo parênquima, ou agrupadas formando nódulos ao redor da veia centrolobular. Quando isoladas essas células são difíceis de distinguir de hepatócitos adjacentes, porém são facilmente reconhecíveis quando aglomeradas (DRIEMEIER et al., 1998). Tais células foram também observadas no baço de alguns casos. Nos linfonodos hepáticos e mesentéricos, apresentam-se em infiltrados maiores, associados com áreas de necrose e hemorragia, e principalmente presentes nos seios linfáticos. Alguns acúmulos de hemossiderina são evidentes nos bordos dos agrupamentos de macrófagos espumosos, que adquirem cor azulada, quando submetidos ao método de coloração azul da Prússia. Entretanto, não se coraram pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e são Oil red negativas, ou fracamente positivas. Quando observados através de objetiva de imersão, os macrófagos espumosos apresentam, esporadicamente, estruturas com imagens negativas de cristais, semelhantes a fendas de colesterol. Estas imagens negativas indicam que as estruturas cristalóides foram dissolvidas pelo solvente utilizado durante o processamento das amostras (DRIEMEIER et al., 1998).

2.3.5. Achados ultra-estruturais

Ao serem observados em microscópio eletrônico, os hepatócitos revelam hiperplasia do retículo endoplasmático liso. Observou-se também estruturas em forma de fendas no citoplasma de hepatócitos e macrófagos, que representam as imagens negativas dos cristais. Essas estruturas apresentam-se revestidas, parcial ou totalmente, por membranas, assemelhando-se a fagolisossomos (DRIEMEIER et al., 1998).

2.3.6. Diagnóstico

O diagnóstico deve ser fundamentado no maior número de dados possíveis, sobretudo naqueles obtidos pelo histórico, exames clínicos e necropsia. É importante considerar os diagnósticos diferenciais, pois diversos agentes etiológicos podem produzir fotossensibilização (TOKARNIA et al., 2000). A inspeção das pastagens para identificar a presença e a quantidade da planta suspeita e a determinação do quadro clínico-patológico são fundamentais, pois não existem ainda testes diagnósticos para a

fotossensibilização. Em alguns casos pode ser interessante, ou mesmo necessário, complementar o diagnóstico através de exames laboratoriais.

Os exames bioquímicos são importantes na discriminação do diagnóstico inicial, complementando os achados do histórico e do exame físico, antes de fazer a seleção de testes mais definitivos ou invasivos (BLOOD & HENDERSON, 1973). Tais exames incluem (1) dosagem de albumina, fatores de coagulação, substâncias metabolizadas pelo fígado como bilirrubina, colesterol e triglicerídios, além de certas drogas; (2) dosagem de compostos endógenos liberados pelos hepatócitos danificados: enzimas como GLDH, SDH, OCT, ICDH, CH e guanase, as quais estão presentes em alta quantidade no fígado e podem ser usadas para avaliar-se o estado funcional dos hepatócitos (GEORGIEV et al., 1979); (3) dosagem de metabólitos endógenos como os ácidos biliares, bilirrubina e amônia, ou metabólitos exógenos como a cafeína; (4) testes que avaliam a circulação entero-hepática através da dosagem de metabólitos endógenos (ácidos biliares) (ANWER & MEYER, 1995); (5) dosagem de pigmentos biliares séricos (determinação de bilirrubina direta e indireta): na obstrução parcial e na lesão dos hepatócitos há aumento da bilirrubina direta sérica, entretanto as concentrações totais de bilirrubina sérica podem estar modificadas devido a alterações na absorção, na capacidade de conjugação ou na excreção dos hepatócitos, ou ainda devido à estase biliar causada por obstruções dos ductos biliares (CORNELIUS, 1989); e (6) dosagem de enzimas séricas tais como a gama glutamil transferase que mede o grau de colestase intra e extra hepática, pois é originada no tecido hepático biliar (CORNELIUS, 1989).

Os exames histológicos são considerados de alto valor diagnóstico, pois as lesões hepáticas embora causem acúmulos de células espumosas em determinadas áreas podem ser consideradas difusas (DRIEMEIER et al., 1998), pois as lesões são características e há possibilidade de se estudar amostras obtidas durante a necropsia, ou através de biópsias hepáticas, as quais permitem saber o tipo e extensão das alterações patológicas, auxiliando no diagnóstico ou prognóstico (FELDMAN & ETTINGER, 1976). Deve-se executar a técnica correta e adequadamente, evitando assim lesar o órgão e aumentar as complicações, tais como hemorragia e infecção (SIMPSON & ELSE, 1987). Adicionalmente, pode-se recorrer a exames micológicos, bacteriológicos, virológicos e outros. Entretanto, o achado de um agente etiológico não é suficiente para confirmar uma doença.

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas isoladas ou ligadas a carboidratos, de origem animal ou vegetal e não antigênicas. Além de sua função

biológica na defesa do hospedeiro, elas podem ligar-se aos carboidratos presentes na superfície ou no interior da célula com muita especificidade e reversibilidade. Estas substâncias têm sido utilizadas para estudar processos de reconhecimento, diferenciação e especialização celular funcional, como consequência da marcada especificidade por receptores de célula, tecido e espécie animal. Os açúcares da superfície celular são importantes no reconhecimento e nas interações da diferenciação e desenvolvimento embrionários. Os principais hidratos de carbono presentes nos vegetais estão apresentados na Tabela 1 (FREAR, 1956).

2.3.7. Tratamento

A primeira providência a ser tomada é retirar o rebanho dos pastos, onde se está observando o problema, evitando o consumo da planta. A seguir, deve-se tratar sintomaticamente as lesões de pele e as alterações hepáticas dos animais doentes (MORTIMER et al., 1978; TOKARNIA et al., 2000), pois ainda não existe um tratamento específico para a doença.

Tabela 1 . Principais carboidratos presentes nos vegetais.

Açúcares		Não açúcares	
Monossacarídeos	Oligossacarídeos	Polissacarídeos	Compostos hidrocarbonados
Trioses: Gliceraldeído.	Dissacarídeos: Sacarose Maltose Trehalose Celobiose Melibiose.	Pentoses: Arabinose Xilose	Uronídeos: Hemiceluloses Pectinas Mucilagens Gomas
Pentoses: Arabinose Xilose Ribose	Trissacarídeos: Rafinose Melecitose Gentianose Ramnose	Hexoses: Dextrina Amido Inulina Galactose Frutose Manose Celulose	Glicosídeos Saponinas Antocianídricas Antracênicas Flavônicas Fenólicas Esterólicas Sulfuroses Nitrogenadas
Hexoses: Glicose Frutose Galactose Manose Metilpentose: Ramnose	Tetrassacarídeos: Estaquiase		

Fonte: adaptado de (FREAR., 1956).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material e técnicas histoquímicas

Foi utilizado um grupo de 100 bovinos da raça Nelore, adultos, com idade de 3 a 4 anos, machos, castrados e provenientes do Estado do Mato Grosso. Todos os animais eram criados em pastagens onde foi comprovada a presença de *Brachiaria decumbens* e/ou *Brachiaria brizantha*. Fragmentos de fígado, linfonodos mesentéricos, hepáticos e de duodeno foram colhidos em matadouros e fixados em solução de formalina tamponada a 10%. Amostras semelhantes foram obtidas de cinco bovinos holandês, com 3 anos de idade e procedentes de cinco diferentes propriedades do Rio Grande do Sul, onde não havia pastagens de *Brachiaria* spp. e, portanto, serviram como controles.

As amostras fixadas em formalina foram avaliadas, macroscopicamente, quanto ao seu aspecto e os linfonodos hepáticos e mesentéricos foram comparados entre si e com os controles. Tecidos selecionados foram incluídos em parafina, cortados a 5 µm e corados pela hematoxilina-eosina. As técnicas histoquímicas realizadas incluíram as reações de Perls e Ziehl-Neelsen.

3.2. Lectinoistoquímica

Amostras representativas de fígado, linfonodos hepáticos e mesentéricos dos grupos experimental e controle foram selecionadas para exame histoquímico de lectinas. Sete lectinas, de diferentes especificidades (E-Y-Laboratories, San Mateo, CA), foram utilizadas. Cortes de 5 µm desparafinados foram incubados em peróxido de hidrogênio 0,3% e metanol durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavados diversas vezes em 0,01 M solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 e tratados com albumina sérica bovina em PBS por 15 minutos. Subseqüentemente, foram incubadas com lectinas biotinizadas (Tabela 2) durante 1 hora e, posteriormente, com complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 45 minutos. A peroxidase foi ativada por incubação durante 4-10 minutos com solução Tris-HCl 0,05M pH 7,6 e contendo 0,02% de diaminobenzidina e 0,05% de água oxigenada. A seguir, os cortes foram

contra-corados com hematoxilina de Mayer, desidratados por concentrações crescentes de etanol, passados em xilol, montados em Entellan (Merck Co., Darmstadt, Germany) e examinados por microscópio ótico. Cada lectina foi usada a uma diluição de 30µg/ml em PBS, exceto PNA que foi utilizada a uma concentração de 10µg/ml. Como controle negativo do procedimento histoquímico das lectinas, as lectinas foram omitidas antes de efetuar os demais passos do método. Como controle positivo dos macrófagos foram usados linfonodos reativos de animais com mastite. Não se utilizou os linfonodos com paratuberculose porque as lectinas poderiam dar falsos positivos ligando-se as micobactérias.

Tabela 2. Origem das lectinas biotilinas utilizadas, suas respectivas abreviaturas e relação de carboidratos que são marcados.

Lectina	Sigla	Especificidade por carboidrato
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con A	α -D-Man; α -D-Glc
<i>Glycine max</i>	SBA	α -D-GalNAc; β -D- GalNAc; α e β -Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNAc
<i>Ulex europaeus-I</i>	UEA-1	α -L-Fuc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNAc >> NeuNAc
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D- Gal(1-3) GalNAc
<i>Ricinus communis -I</i>	RCA-I	β -D- Gal > α -D-Gal

* (GOLDSTEIN & HAYES, 1978) †Fuc = Fucose; Gal = Galactose; GalNAc = N-acetil-galactosamina; Glc = Glucose; GlcNAc = N-acetil-glicosamina; Man = Manose; NeuNAc = ácido N-acetil-neuramínico.

3.3. Imunoistoquímica

Os testes imunoistoquímicos com anticorpos monoclonais para macrófagos foram realizados em secções de 3µm de espessura, a partir de blocos de parafina dos órgãos, utilizando-se o método de estreptavidina-biotina, conforme descrito a seguir. Após desparafinados com xilol, os cortes eram hidratados pelo método convencional utilizando concentrações decrescentes de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por um banho de 30 minutos com água oxigenada 3% em metanol. Após a lavagem em água destilada, realizou-se a recuperação antigênica com 2 métodos: digestão com tripsina 0,1 % a 37°C por 10 minutos e, posteriormente, as secções foram imersas em 15 ml de tampão citrato 0,01M pH 6,0 e irradiadas 2 vezes consecutivas, de 3 minutos cada, em um forno de microondas doméstico, com uma potência aproximada de 700W. A cada intervalo de 2 minutos, o nível de tampão foi recomposto. Deixou-se

esfriar durante 20 minutos. Logo após um lavado com PBS, aplicou-se caseína 0,5 % por 2 minutos. As secções foram incubadas com anticorpo primário durante 18 horas a 4°C, depois com anticorpo secundário biotinalado durante 1 hora a 37°C e, finalmente, com o conjugado streptavidina–biotina-peroxidase durante 30 minutos a 37°C. Como cromógeno, foi utilizado 3,3-diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas. Diferentes diluições de anticorpos primários foram testadas e, finalmente, foi adotada a diluição 1:200. As células marcadas positivamente apresentaram-se com cor marrom escura, conferida pelo produto da reação 3,3-DAB tetrahydrocloridato-água oxigenada. Para imunoistoquímica laminas com tecido de intestino de bovinos com paratuberculose foram utilizadas como controle positivo.

4. RESULTADOS

As lesões macro e microscópicas não diferiram substancialmente das lesões anteriormente descritas em bovinos que consumiram *Brachiaria* spp.

4.1. Achados macroscópicos

As lesões mais acentuadas foram encontradas no fígado e nos linfonodos mesentéricos e hepáticos. No fígado, observou-se que a coloração das amostras de fígado fixadas em formalina tamponada era visivelmente amarelada quando comparada com amostras de fígado de bovinos que não ingeriam *Brachiaria* spp. (Figura 1).



Figura 1. Fígados fixados em formalina a 10% comparação de um fígado normal (esquerda) em relação ao fígado de animal alimentado por *Brachiaria* sp. (direita) de cor amarelada.

Os linfonodos estavam de tamanho normal, mas na seção de corte observou-se estriações esbranquiçadas de forma radiada disseminadas na cortical e na medular, com pequenas áreas brancas nodulares multifocais, principalmente, na medular. As alterações eram mais acentuadas nos linfonodos hepáticos, quando comparados aos

linfonodos mesentéricos do mesmo animal (Figura 2). O intestino delgado não apresentou alteração macroscópica.



Figura 2. Superfície de corte dos linfonodos hepático e mesentérico de um mesmo animal alimentado com *Brachiaria* sp. após fixação em formalina. Observa-se presença de estrias esbranquiçadas na cortical do linfonodo hepático (Setas) em relação ao linfonodo mesentérico.

4.2. Achados histológicos

O fígado apresentou áreas de colangite multifocal, principalmente nas tríades portais e discreta proliferação do tecido fibroso na região periportal. Proliferação de células dos ductos biliares também foi observada. A maioria dos hepatócitos apresentava graus variáveis de tumefação celular, alguns poucos também necrose. Outros achados frequentes incluíram bilestase e pericolangite linfocitária. Não foram observadas alterações macro ou microscópicas nos intestinos coletados.

No fígado, havia infiltração de macrófagos com aspecto espumoso que se apresentaram em aglomerados, às vezes fundidos, formando células gigantes, multinucleadas e distribuídos, aleatoriamente, no parênquima (Figura 3).

Linfadenite granulomatosa estava presente nos linfonodos mesentéricos e hepáticos e caracterizou-se pela presença de macrófagos com citoplasma espumoso, sendo muitos multinucleados e dispostos entre os centros linfóides, em forma de linhas paralelas (Figura 4). Focos de necrose com hemorragias extensas estavam associados à infiltração macrofágica. Alguns acúmulos de hemossiderina eram evidentes nos bordos dos acúmulos macrofágicos. Alguns macrófagos espumosos exibiam ainda depósitos de

conteúdo amarelado Perls positivo. No intestino, infiltrados de macrófagos espumosos multifocais foram observados na submucosa (Figura 5), algumas vezes associado com focos de necrose e em vasos linfáticos dos intestinos.

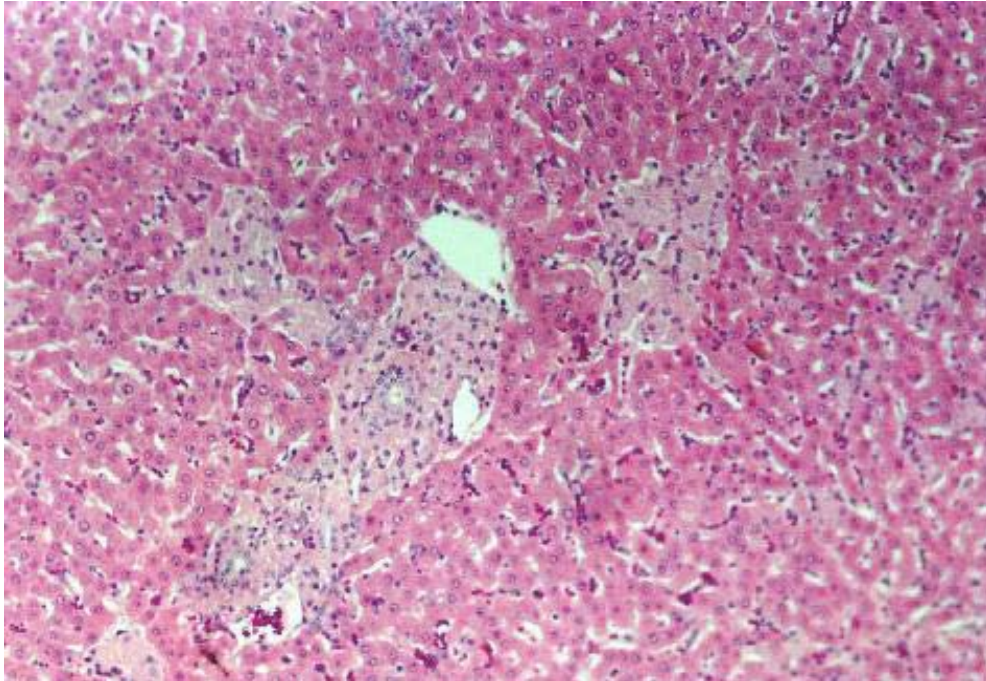


Figura 3. Corte histológico de fígado apresentando infiltração multifocal de macrófagos espumosos Obj. 10 HE.

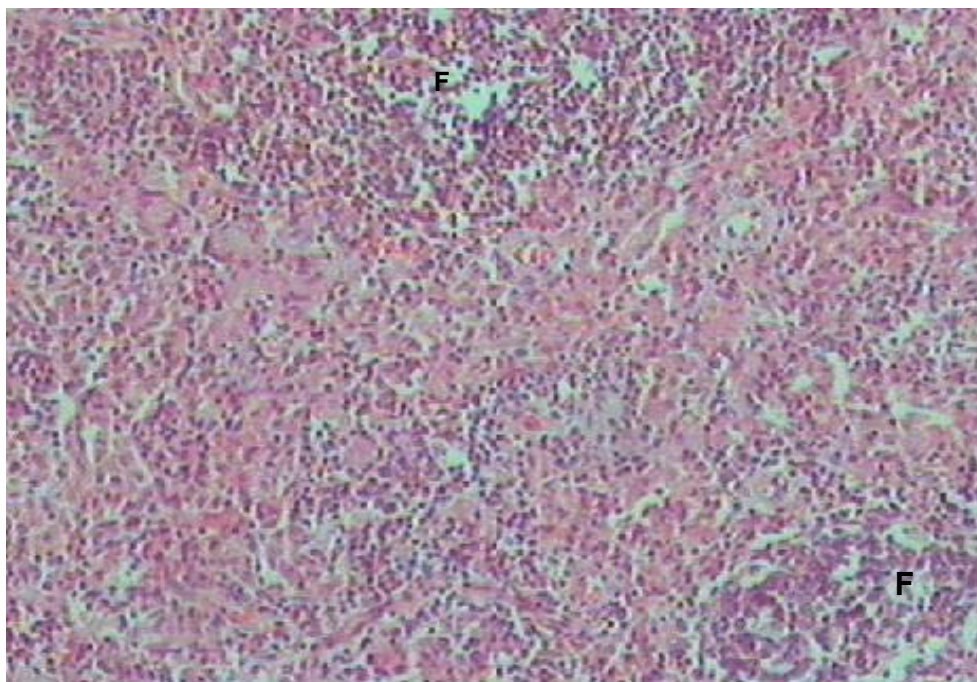


Figura 4. Corte histológico linfonodo hepático apresentando infiltração de macrófagos espumosos entre dois centros foliculares (F) da cortical de forma linear Obj 10 HE.

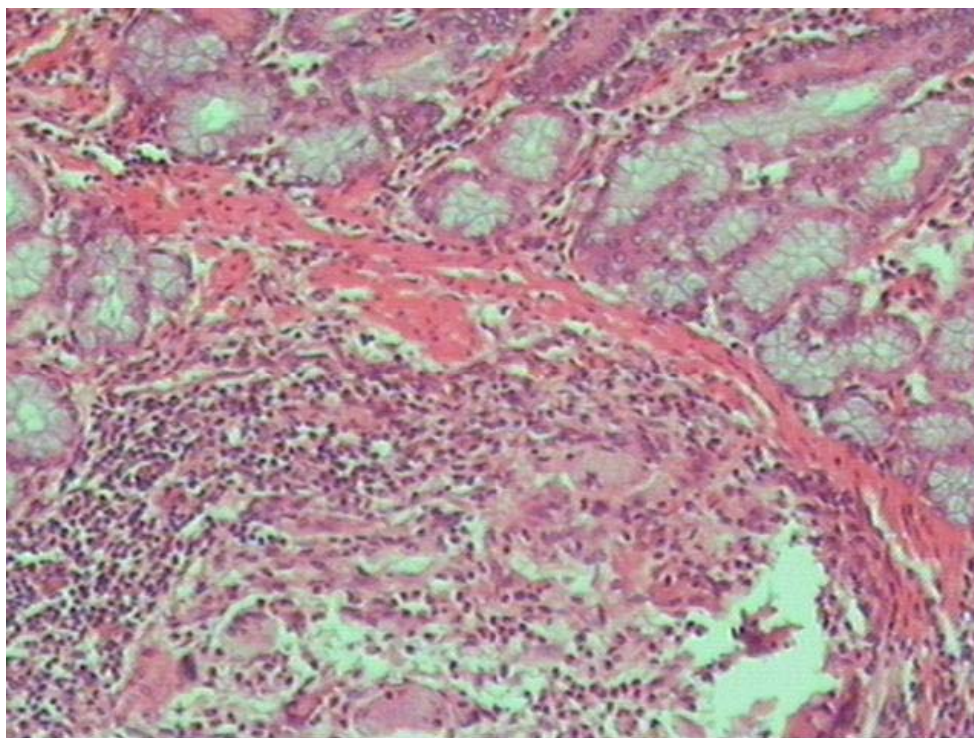


Figura 5. Duodeno, infiltrado de macrófagos espumosos na submucosa. Obj. 10. HE.

Tabela 3. Achados histológicos no fígado.

Alterações mais importantes	Porcentagem
Colangite	100%
Tumefação e/ou necrose dos hepatócitos	100%
Células espumosas	91% Difíceis de observar isoladamente
Colestase	75%

Tabela 4. Achados histológicos no linfonodo.

Alterações mais importantes	Porcentagem
Linfadenite	100%
Necrose	85%
Células espumosas	100% Mais abundante que no fígado
Hemorragia	65%

Tabela 5. Achados histológicos no intestino delgado.

Alterações mais importantes	Porcentagem
Necrose	62%
Células espumosas	54%
	Difíceis de observar isoladamente

4.3. Técnicas histoquímicas

Através da Coloração de Perls, constataram-se as células espumosas com o citoplasma azul claro. Quando utilizada a técnica de Reação de Ziehl-Neelsen, os resultados foram negativos.

4.4. Lectinoistoquímica

Além de se haver comparado o padrão de afinidade das lectinas observado nos fígados dos animais normais com o observado nos alimentados com *Brachiaria* spp, se observou também que algumas lectinas marcaram mais intensamente as células de citoplasma espumoso. A PNA marcou intensamente e mais especificamente as células espumosas no fígado (Figura 6) e linfonodo (Figura 7). A SBA também marcou intensamente as células espumosas, mas também marcou o tecido conjuntivo, o endotélio, os hepatócitos e os sinusóides dos animais alimentados com *Brachiaria* sp. A mesma comparação entre animais alimentados com *Brachiaria* sp. e sadios foi realizada em relação às amostras de linfonodos. Duas lectinas marcaram as células espumosas com maior intensidade: a PNA que além de marcar as células espumosas, marcou os macrófagos nos animais sadios e nos intoxicados. E WGA, que não marcou outras estruturas e, portanto, foi a mais específica dentre as estudadas. As demais lectinas marcaram, leve a moderadamente, as células espumosas. Os resultados da lectinoistoquímica em amostras de fígado e linfonodos estão apresentados nas tabelas 6 e 7.

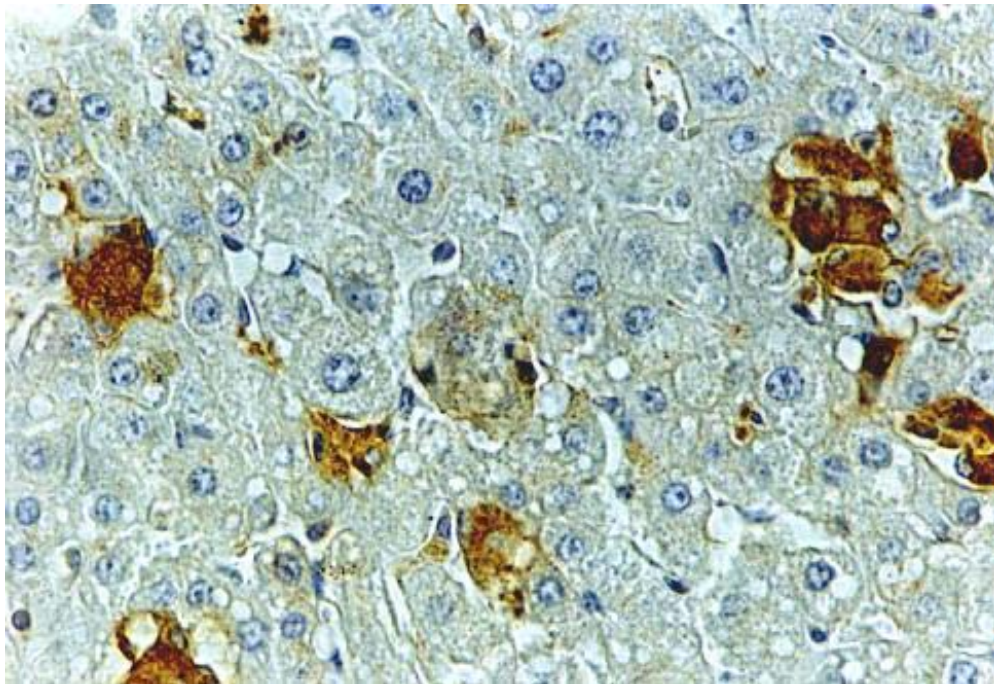


Figura 6. Lectinoistoquímica PNA identificando os macrófagos espumosos no fígado Obj. 20.

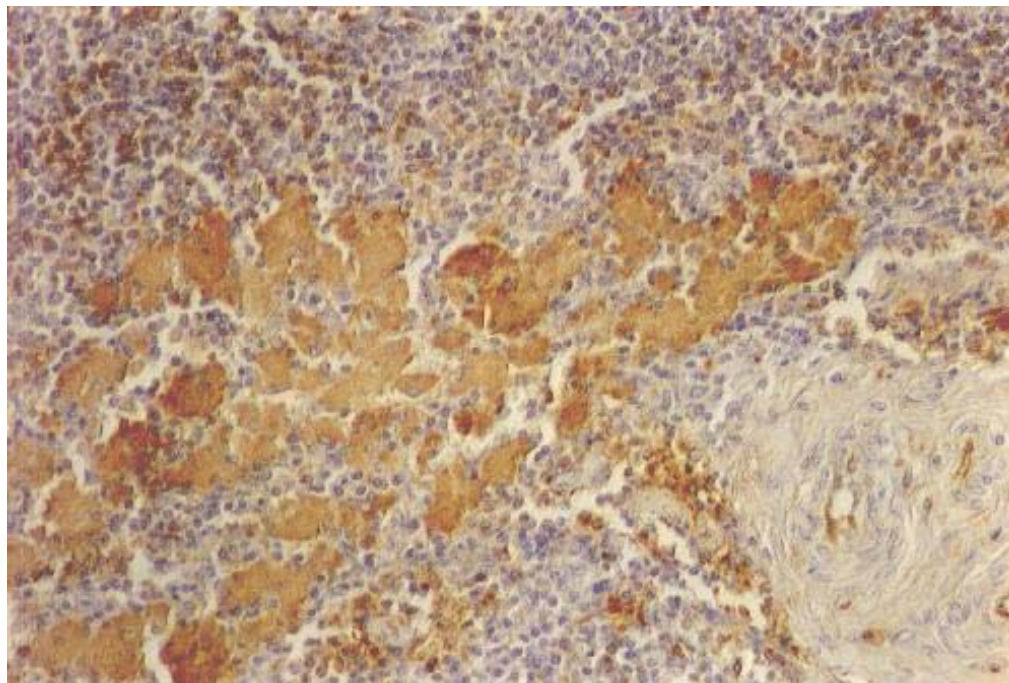


Figura 7. Lectinoistoquímica PNA evidenciando macrófagos espumosos no linfonodo mesentérico Obj. 10.

Tabela 7. Intensidade dos sítios de união das lectinas no fígado e no linfonodos dos animais alimentados com *Brachiaria* sp. e dos normais.

Células	LECTINAS NO LINFONODO													
	UEA-I		PNA		RCA-I		SBA		DBA		WGA		Con A	
	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
Células espumosas	-	2	-	3	-	2	-	2	-	1-2	-	3	-	0
Células de tecido conetivo	0	0	0	1	0	2	0	2	0	0	3	2	2-3	2
Macrófagos	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células endoteliais	0	0	0	2	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0
Células do córtex folicular	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células do centro germinativo	0	3	0	2	0	3	3	3	0	3	0	0	0	0
Células paracorticais	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Células de cordões medulares	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Células de seios linfáticos	0	3	3	2-3	3	0	3	0	0	2	3	0	0	0

*O numero indica a intensidade de coloração numa escala subjetiva desde 0:sem reação; 1: reação leve; 2: reação moderada; 3: reação mais intensa. N: animais que não ingeriram *Brachiaria* sp. I: animais alimentados com *Brachiaria* sp.

4.5-Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi utilizada para visualizar o grau de positividade ou ausência de reação nos macrófagos com anticorpo contra monócitos MAC 387, principalmente nos macrófagos espumosos. Linfonodos de animais com paratuberculose foram utilizados como controle. As células que marcaram o citoplasma em marrom escuro foram consideradas positivas. No fígado e nos linfonodos os macrófagos espumosos não mostraram reação fortemente positiva. No intestino somente os macrófagos com pouco citoplasma eram positivos (Figura 8).

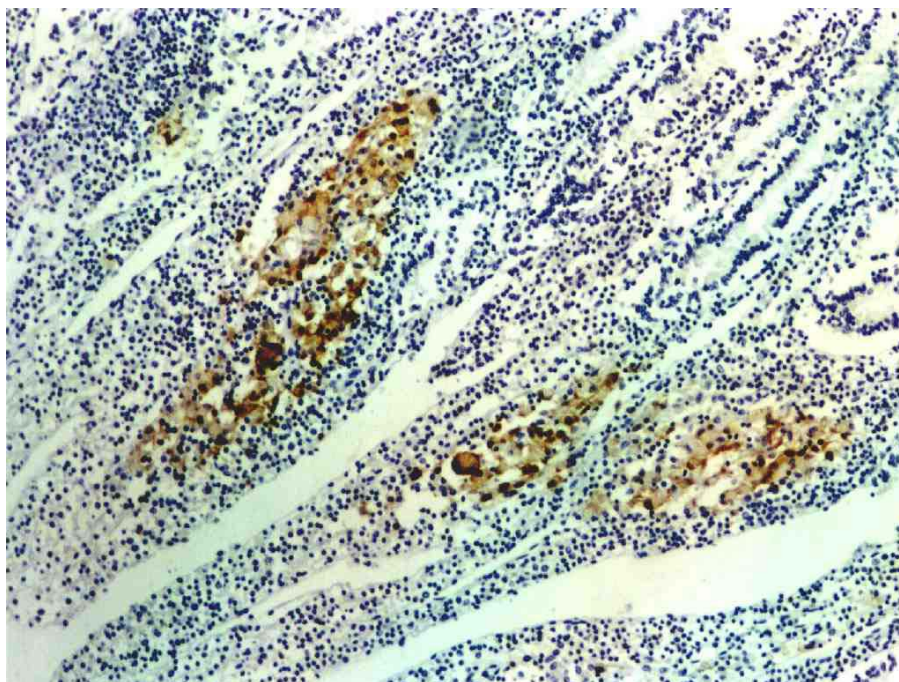


Figura 8. Imunoistoquímica anti-monócitos de bovinos (anticorpo Mac 387) Material controle paratuberculose bovina com marcação de macrófagos epitelióides na mucosa do intestino Obj. 10.

5. DISCUSSÃO

As alterações macroscópicas e histológicas observadas nos linfonodos hepáticos e mesentéricos e nos fígados dos bovinos deste estudo que eram mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp foram semelhantes às descritas nas intoxicações de ruminantes por *Brachiaria* sp (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1997, CRUZ et al., 2000). As amostras estudadas foram obtidas de animais que consumiam pastagens de *B. decumbens* e *B. brizantha*, ambas firmam envolvidas em surtos de fotossensibilizações (LEMOS et al., 1997). Não são completamente conhecidos os mecanismos envolvidos na deposição e concentração de cristais no fígado, nos linfonodos hepáticos e mesentéricos e intestinos de animais que consomem essas plantas. Maiores quantidades de estruturas cristalóides têm sido encontradas nos linfonodos hepáticos em relação aos linfonodos mesentéricos. Este aspecto sugere que a metabolização das saponinas presentes nas plantas, provavelmente, ocorra no fígado e que seus produtos sejam excretados através da bile, podendo ser reabsorvidos através do ciclo êntero-hepático da bile.

A presença de macrófagos espumosos no intestino delgado pode estar associada com problemas de má-absorção de nutrientes e com obstrução de vasos linfáticos, à semelhança do que se observa em casos de paratuberculose dos bovinos. É provável que esta alteração possa produzir interferência no ganho de peso dos animais criados sobre essa pastagem, como já foi observado em um rebanho alimentado com *Brachiaria* spp. (RIET-CORREA et al., 2002).

Algumas teorias, ainda não completamente esclarecidas, têm sido propostas para explicar a etiopatogenia destas intoxicações. Alguns autores consideram que as saponinas causam, por si só, as alterações observadas (MATHEWS, 1937; ABDELKADER et al., 1984; LANCASTER et al., 1991), enquanto outros acreditam que não seriam a única causa das lesões (FLAOYEN et al., 1991 e 1993). Uma hipótese enuncia que a fotossensibilização hepatógena é causada pelo bloqueio do fluxo da bile causado pelo material cristalóide, acarretando a retenção de filoeitrina (KELLERMAN & COETZER, 1985; COETZER et al., 1983), como acontece na intoxicação por

Tribulus terrestris. Outra teoria sugere que o dano no parênquima seria o responsável pela retenção de filoeitrina (GRAYDON et al., 1991), como ocorre na doença produzida por *Nartheicum ossifragum* (FLAOYEN et al., 1991) e por *Tribulus terrestris* (KELLERMAN et al., 1980). Neste ultimo caso, não se encontraram cristais na reprodução experimental através da administração de saponinas da planta (KELLERMAN et al., 1991). Finalmente, outra hipótese sugere que as toxinas atuem primariamente nas membranas dos canalículos biliares à semelhança do que ocorre com os tripterpenos pentacíclicos na intoxicação por *Lantana* spp. (SMITH & MILES, 1993; MILES et al., 1994), cujas lesões características estão ausentes no “geeldikkop”. Nas intoxicações produzidas pelas plantas *P. dichotomoflorum*, *Nartheicum ossifragum* (AAS & ULVUND, 1989) e *T. terrestris* (KELLERMAN et al., 1991), se admite que a contribuição de uma micotoxina esporidesmina no processo exacerbaria a fotossensibilização.

As células de citoplasma espumoso apresentavam-se distribuídas em todo parênquima hepático, de forma irregular, entretanto mais concentrados e formando nódulos ao redor da veia centrolobular. Nos linfonodos, tais células estavam associadas com áreas de necrose e hemorragia, além de aparecerem em maior número. No intestino delgado as lesões têm sido menos características e, na submucosa intestinal, pequena quantidade de células espumosas foram encontradas.

O aparecimento destas células espumosas foi observado a partir de 1976 e coincide com o surgimento dos primeiro casos de intoxicação em animais manejados em pastagens de *Brachiaria decumbens* e a introdução desta planta como espécie amplamente utilizada para alimentação de ruminantes domésticos, especialmente no Brasil Central (DRIEMEIER et al., 1998). SILVA, (1989) observou a presença, ainda que incipiente, de células espumosas no fígado de bovinos jovens de 5 a 8 meses e sem sinais de fotossensibilização, entretanto, nos animais mais velhos, estas células eram mais evidentes e freqüentes. Tanto o longo período de ingestão da planta necessário para sua ocorrência, como a morfologia destas células espumosas (DRIEMEIER et al., 1998) são evidências que nos sugerem classificá-las como macrófagos.

Células espumosas apresentam-se em diversos tecidos e em diferentes condições patológicas, sendo as mais conhecidas as do processo de arteriosclerose. Considerando que, segundo Patrick (1983), as alterações patológicas em seres humanos que causam obstrução de ductos biliares cursam com coleções de macrófagos, com ou sem a formação de células multinucleadas, possivelmente exista uma relação entre o grau de

obstrução biliar e as células espumosas. Também se postulou que sua presença poderia estar relacionada à absorção êntero-hepática de substâncias presentes na alimentação, pois estão presentes somente no fígado e linfonodos mesentéricos e hepáticos.

Ainda não está definido o conteúdo destas células. No processo de arteriosclerose, aparecem células espumosas semelhantes contendo cristais de colesterol. O conteúdo aqui estudado demonstrou ser apenas fracamente positivo para coloração de gordura. A imagem negativa das estruturas cristalóides indica que estas eram dissolvidas com os solventes usados no processamento das amostras, tanto em microscopia óptica como eletrônica, possivelmente por solventes orgânicos usados nesses processos (DRIEMEIER et al., 1998). As reações positivas, observadas nas células espumosas sob o método de Perls, evidenciam a presença de depósito de sais férricos. Nas aortas com arteriosclerose, acontece o mesmo depósito em consequência da fagocitose exercida pelos macrófagos sobre os eritrócitos extravasados, o que poderia acontecer nestes casos também.

A identificação dos componentes do sistema imune, através da técnica de imunistoquímica, é importante para pesquisa e diagnóstico da doença. Neste caso, utilizou-se formaldeído 10% como fixador de amostras destinadas a imunistoquímica, pois a conservação de antígenos citoplasmáticos tem sido melhor com este método (GUITERREZ et al., 1999). Também porque o epítipo do Mac 387 é uma calproteína citoplasmática. Entretanto, este fixador pode destruir a imuno-reatividade de muitos antígenos sob circunstâncias como exposição prolongada (LEONG & GILHAM, 1989). Para compensar este problema e facilitar a detecção dos epítipos mascarados pelo fixador, utilizaram-se as técnicas de microondas e enzimas, baseando-se em resultados positivos de um estudo prévio (GUITERREZ et al., 1999). As amostras de tecidos utilizadas no presente estudo permaneceram no fixador por um período não inferior a 10 dias.

A imunistoquímica resultou positiva em alguns macrófagos, confirmando a eficácia da técnica, mas não nos macrófagos espumosos. No entanto as células espumosas têm aspecto típico de macrófagos em função das características morfológicas evidenciadas tanto na microscopia óptica como na eletrônica (DRIEMEIER et al., 1998). Além disto, o surgimento destas células nas fases tardias da reposta inflamatória constitui evidência adicional favorável à hipótese dos macrófagos. As células espumosas freqüentemente podem ser comparadas às células “Gitter” também

considerados macrófagos encontradas em fases de remoção de tecido nervoso necrosado no sistema nervoso central.

Outra justificativa para a inexistência de reação de macrófagos espumosos deve-se a alta especificidade dos anticorpos utilizados contra monócitos. A doença, o tempo de permanência sobre a pastagem, a época do ano, os órgãos ou a idade destes animais podem ter influenciado na negatividade do resultado. Uma importante heterogeneidade antigênica entre diferentes macrófagos tem sido revelada em trabalhos prévios de imunoistoquímica, considerando tanto órgãos linfóides como não linfóides, condições normais como patológicas, além de diferentes idades e espécies (BULLIDO et al. 1997, JUTILA et al. 1993, HOOGSTEDEN et al. 1999). Tal aspecto sugere que o estudo da imunoistoquímica é uma ferramenta importante para determinar o grau de diferenciação, ativação e maturação das células (TODD & SCHLOSSMAN, 1982; BULLIDO et al., 1997; BARDADIN et al., 1991). Neste trabalho, poderíamos atribuir a negatividade da marcação à heterogeneidade, anteriormente, mencionada. Os resultados positivos obtidos em um estudo prévio estiveram associados a animais de menor idade, normais e em linfonodos retrofaríngeos (GUITERREZ et al., 1999). Conseqüentemente, não podemos assegurar que as células espumosas não são macrófagos. Estudos adicionais incluindo outros anticorpos e considerando outras características celulares são necessários para uma conclusão definitiva. Algumas células espumosas apresentam ainda citoplasma levemente amarelado e são positivas na coloração de Perls o que justifica serem estas células macrófagos.

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas isoladas ou ligadas a carboidratos, de origem animal ou vegetal e não antigênicas. Além de sua função biológica na defesa do hospedeiro elas podem se ligar aos carboidratos presentes na superfície ou no interior da célula com muita especificidade e reversibilidade. Adicionalmente, se observaram alterações em suas concentrações em condições patológicas. Durante muito tempo, fundamentando-se em suas propriedades, as lectinas têm sido utilizadas para estudar processos de reconhecimento, diferenciação e especialização celular funcional, como conseqüência da marcada especificidade por receptores de célula, tecido e espécie animal. (DANGUY et al., 1988).

Estudos envolvendo fígados de outras espécies revelaram diferenças de afinidade das lectinas, quando submetidas a condições patológicas ou normais. Encontrou-se afinidade de PNA por células de Kupffer ativadas em doenças inflamatórias do fígado nos humanos, mas não em condições normais (MIYAMOTO, et

al., 1997). Em fígados de ratas, isto não foi observado. Estas constatações demonstram que existem diferenças espécie-específicas. RCA-I e SBA também reagem positivamente nos fígados e nos linfonodos SBA, mas não são tão seletivas como PNA.

Neste trabalho, observou-se que a PNA teve uma afinidade, quase exclusiva, pelas células espumosas em todos os tecidos analisados. Portanto, considera-se que PNA representa a lectina de eleição para marcação seletiva das células espumosas. Além disso, as células de Küpffer não foram marcadas, mas os macrófagos do linfonodos dos animais normais e intoxicados sim. Em outros estudos também se demonstrou que a PNA é muito útil para a identificação dos macrófagos em humanos (HOWARD & BATSAKIS, 1982; REE & KADIN, 1985). As células de Küpffer geralmente são negativas para a PNA nos fígados normais, e são positivas nas doenças que produzem sua ativação (NIKI et al., 1995). Isto indicaria que as células espumosas são macrófagos e as células de Kupffer não se ativam na intoxicação por *Brachiaria* spp.

6. CONCLUSÕES

1) A lectina PNA é útil como marcador das células espumosas que aparecem nos animais alimentados com *Brachiaria* sp. como consequência de suas altas afinidade e especificidade de marcação.

2) A marcação específica da lectina PNA permitiu observar que as células espumosas, não somente se apresentaram em acúmulos, mas também foram observadas em distribuição isolada, aspecto não evidenciado pelos outros métodos de coloração.

3) A presença do ferro no interior das células espumosas, evidenciada pela reação de Perls, também reforça a hipótese de que estas células sejam macrófagos, pois indica uma atividade fagocítica.

4) A presença de macrófagos espumosos no intestino delgado é morfológicamente semelhante às alterações causadas por paratuberculose em bovinos embora em menor intensidade seja menor que na paratuberculose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, O., ULVUND, M.J. Do microfungi help to induce the phototoxic disease alveld in Norway? **Vet. Rec.**, v. 124, p. 563, 1989.
- ABDELKADER, S.V., CEH, L., DISHINGTON, I.W., HAUGE, J.G. Alveld-producing saponins. II Toxicological studies. **Acta Vet. Scand.**, v. 25, p. 76-85, 1984.
- ABDULLAH, A.S., NORDIN, M.M., RAJION, M.A. Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in sheep: changes in motility and pH of reticulo-rumen. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 30, n. 3, p. 256-258, 1988.
- ABDULLAH, A. S., LAJIS, N.N., BREMNER, J.B., DAVIES, N.W., MUSTAPHA, W., RAJION, M.A. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 34, n. 2, p. 154-155, 1992.
- AGOSTINIS, P., VANTIEGHEM, A., MERLEVDE, W., DE WITTE, P.A. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.34, n. 3, p. 221-41, 2002.
- ALESSI, A.C. , FAGLIARI, J.J., OKUDA, H.T., PASSIPIERI, M. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. 4 - Lesões hepáticas. **Arq. Bras. Vet. Zoot.**, v. 46, n. 4, p. 319-328, 1994.
- ALVAREZ, L., PEREZ, M.C., GONZALEZ, J.L., NAVARRO, V., VILLAREAL, M.L., OLSON, J.O. SC-1, an antimycotic spirostan saponins from *Solanum chysotrichum*. **Planta Med.**, v .67, n. 7, p. 372-374, 2001.
- AMARAL, R.E., NAZÁRIO, W., ANDRADE, S.O. Ocorrência do fungo *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M.B. Ellis em grãos e forrageiras no Brasil. In . [IX CONGRESSO BRAS. FITOPATOLOGIA], Campinas, **anais**, p. 82, 1976.
- ANDRADE, S.O., LOPES, H.O.S., BARROS, M.A., LEITE, G.G., DIAS, S.M.C., SAUERESSING, 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, n. 2, p. 117-136, 1978.
- ANWER, M.S., MEYER, D.J. Bile acids in the diagnosis, pathology, and therapy of hepatobiliary diseases. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** ,v.25, n.2, p.503-517, 1995.
- BABER, R. Photosensitization: a note of caution in the use of *Brachiaria* pastures – A review. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v. 21, p. 277-280, 1989.

BARDADIN, K.A., SCHEUER, P.J., PECZEK, A. WEJMAN, J. Immunocytochemical observations on macrophage populations in normal fetal and adult human liver. **J. Pathol.**, v.164, n.3, p.253-259, 1991.

BARRERA, J.M., OCHOA, R. *Brachiaria decumbens* y fotossensibilizacion. **Rev. ICA – Bogotá (Colombia)**. n. 3, p. 231-240, 1977.

BEZILLE, P., BRAUN, J.P., BARS, J. Première identification de l'eczème facial chez les ovins en Europe. Aspect épidémiologiques, cliniques et biologiques. **Rec. Med. Vet.**, v. 160, n. 4, p. 339-347, 1984.

BLOOD, D.C., HENDERSON, J.A. **Medicina veterinaria**, Interamericana, Argentina, 986 p., 1973.

BREWER, D., RUSSELL, D.W., AMARAL, R.E. M., AYCARDI, E.R. An examination of North and South American isolates of *Pithomyces chartarum* for production of sporidesmin and sporidesmolides. **Proc. N. S. Inst. Sci.**, n. 38, p. 73-81, 1989.

BRIDGES, C.H., CAMP, B.J., LIVINGSTON, C.W., BAILEY, E.M. Kleingrass (*Panicum coloratum* L.) poisoning in sheep. **Vet. Pathol.** n. 24, p. 525-531, 1987.

BULLIDO, R., GOMEZ DEL MORAL, M., ALONSO, F., EZQUERRA, A., ZAPATA, A., SANCHEZ, C., ORTUNO, E., ALVAREZ, B., DOMINGUEZ, J. Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. **Tissue Antigens**, v. 49, n.4, p.403-413, 1997.

CAMARGO, W.V.A., NAZÁRIO, W., FERNANDES, N.S., AMARAL, R.E.M. Fotossensibilização em bovinos de corte. Provável participação do fungo *Pithomyces chartarum*, na etiologia do processo. **O Biológico**, v. 42, n. 11 e 12, p. 259-261, 1976.

CAMP, B.J., BRIDGES, C.H., HILL, D.W., PATAMALAI, B., WILSON, S. Isolation of a steroidal sapogenin from the bile of a sheep fed *Agave lecheguilla*. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 30, n. 6, p. 533-535, 1988.

CANDRA, E., MATSUNAGA, F., FUJIWARA, H., MIMAKI, Y., SASHIDA, Y., YAMAKUNI, T., OHIZUMI, Y. Two steroidal saponins from *Camassia cusickii* induce L 12210 cell death through the apoptotic mechanism. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.79, n.11, p.953-958, 2001.

CARRILLO, B.J., CARCAGNO, C., CORBELLINI, C.N., DUFFY, S.J., MIQUET, J.M., MIGUEL, M.S. Fotossensibilizacion por *Pithomyces chartarum* en bovinos en la República Argentina. – I. Primera comunicacion. **Rev. Investig. Agropec.** v. XV, n. 3, p. 527-537, 1980.

CASTEEL, S.W., WEAVER, A.D., MILLS, L.L., PACE, L.W., ROTTINGHAUS, G.E., SMITH, K.M. Photosensitization outbreak in Shorthorn calves in Missouri. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 3, p. 180-182, 1991.

CHEEKE, P.R. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. **J. Anim. Sci.**, v. 73, n 3, p. 909-918, 1995.

CIAT. Tropical pastures program. Centro Internacional de Agricultura Tropical. **Annual Report** 1984.

CINTRA, A. F., ALENCAR, R. A. A., MELLO, R. E. A., ANDRADE, S. O., NOBRE, D., CAMARGO, W. V., NAZÁRIO, W., AMANTE, E. Informações do Instituto Biológico relativas à fotossensibilização em equinos e bovinos. **O Biológico**, v. 43, n.5-6, p. 141-144, 1977.

CLARE, N.T. Photosensitization in animals. **Adv. Vet. Sci.**, v. 2, p. 182-211, 1955.

COETZER, J.A.W., KELLERMAN, T.S., SADLER, W., BATH, G.F. Photosensitivity in South Africa. V - A comparative study of the pathology of the ovine hepatogenous photosensitivity diseases, facial eczema and geeldikkop (*Tribulosis ovis*), with special reference to their pathogenesis. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 50, p. 59-71, 1983.

COLLIN, R.G., ODRIOZOLA, E., TOWERS, N.R. Sporidesmin production by *Pithomyces chartarum* isolates from Australia, Brazil, New Zealand and Uruguay. **Mycol. Res.**, v. 102, p. 163-166, 1998.

COLLÓN, J.L., JACKSON, C.A., DEL PIERO, F. Hepatic dysfunction and photodermatitis secondary to alsike clover poisoning. **Comp. Cont. Educ.**, v. 9, p. 1022-1026, 1996.

CORNELIUS, C.H. Liver Function. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic. p. 364-396, 1989.

CRUZ, C., DRIEMEIER, D., PIRES, V.S., COLODEL, E.M., TAKETA, A.T.C., SCHENKEL, E.P. Isolation of steroidal saponins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Vet. Human. Toxicol.** v.42, n. 3, 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.

DANGUY, A., KISS, R., PASTEELS, JEAN-LAMBERT. Lectins in histochemistry. **Biological Structures and Morphogenesis**. v. 1, n.3, p.93-106, 1988.

DINAN, L., HARMATHA, J., LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **J. Chromatogr. A**, v.1-2, . n. 23, p.105-123, 2001.

DÖBEREINER, J. Relatório de visita à Fazenda Vargem Bonita, município de Grajaú, Maranhão, no período de 13 a 15 de março de 1985. 5 p. (**datilografado**), 1985.

DÖBEREINER, J., TOKARNIA, H., MONTEIRO, M.C.C., CRUZ, L.C.H., CARVALHO, E.G., PRIMO, A.T. Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiaria decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*. **Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.** v. 11, p. 87-94, 1976.

DONE, J., MORTIMER, P.H., TAYLOR, H. Some observations on facial eczema; liver pathology and determinations of serum bilirubin, cholesterol, transaminase and alkaline phosphatase. **Res. Vet. Sci.**, v. 1, p. 76-83, 1960.

DRIEMEIER, D., BARROS, S.S., PEIXOTO, P.V., TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., BRITO, M.F. Estudos histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1998.

DRIEMEIER, D., DOBEREINER, J., PEIXOTO, P.V., BRITO, M. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 19, n. 2, p. 79-83, 1999.

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

FAGLIARI, J.J., OLIVEIRA, J.A., PASSIPIERI, M. Sintomas de fotossensibilidade em bezerros alimentados com leite materno. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 35, n.4, p. 479-484, 1983.

FAGLIARI, J.J., OLIVEIRA, J.A., LUCAS, A., OKUDA, H.T., PASSIPIERI, M. Fotossensibilização em bovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*. In: [10º ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS]. UNESP, **anais**, 1985.

FAGLIARI, J.J., OKUDA, H.T., KUCHEMUCK, M.R.G., CURI, P.R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. I - Aspectos epidemiológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 45, n. 3, p. 263-274, 1993a.

FAGLIARI, J.J., OLIVEIRA, J.A., KUCHEMUCK, M.R.G., CURI, P.R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. III - Desenvolvimento ponderal de bovinos intoxicados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 45, n. 3, p. 283-289, 1993b.

FAGLIARI, J.J., PASSIPIERI, M., KUCHEMUCK, M.R.G., CURI, P.R. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. II - Aspectos clínicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 45, n. 3, p. 275-282, 1993c.

FAGLIARI, J.J., PASSIPIERI, M., KUCHEMUCK, M.R.G., CURI, P.R. Níveis séricos e hepáticos de ferro, cobre e zinco de bovinos intoxicados naturalmente pela micotoxina esporidesmina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 46, p. , 1994a.

FAGLIARI, J.J., OKUDA, H.T., KUCHEMUCK, M.R.G., CURI, P.R. Estudos de alguns constituintes sanguíneos de bovinos intoxicados naturalmente pela micotoxina esporidesmina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 46, p. , 1994b.

FELDMAN, E.L., ETTINGER, S. Percutaneous transthoracic liver biopsy in the dog. **J. Am. Vet. Med. Association**, v.169, n.8 p.805, 1976.

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

FLAOYEN, A., SMITH, B.L. Parenchymal injury and biliary obstruction in relation to photosensitization in sporidesmin-intoxicated lambs. **Vet. Res. Commun.**, v. 16, p. 337-344, 1992.

FLAOYEN, A., SMITH, B.L., MILES, C.O. An attempt to reproduce crystal-associated cholangitis in lambs by the experimental dosing of sarsasapogenin or diosgenin alone and in combination with sporidesmin. **N. Z. Vet. J.**, v. 41, p. 171-174, 1993.

FLAOYEN, A., WILKINS, A.L. Metabolism of saponins from *Nartheceum ossifragum*-a plant implicated in the etiology of alveld, a hepatogenous photosensitization of sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 21, n. 5., p. 335-345, 1997.

FREAR, D. **Tratado de química agrícola**, Barcelona, Salvat Editores. Tomo I. 234p. 1956.

GARNER, R. J. **Toxicología veterinaria**. Acribia, Espania, 470 p., 1970.

GEORGIEV, P. Enzymatic profile of bovine organs. **Vet. Med. Nauki**, v.16, n. 3, p.22-27, 1979.

GLASTONBURY, J.R.W., DOUGHTY, F.R., WHITAKER, S.J., SERGEANT.E. A syndrome of hepatogenous photosensitization, resembling geeldikkop, in sheep grazing *Tribulus terrestris*.. **Aust. Vet. J.**, v.61, p.314., 1984.

GLENN, B.L., MONLUX, A.W., PANCIERA, R.J. A hepatogenous photosensitivity of cattle. I - Experimental production and clinical aspects of the disease. **Pathol. Vet.**, v. 2, p. 49-67, 1965.

GOLDSTEIN, I.J., HAYES, C.E. The lectins : Carbohydrate-binding proteins of plant and animals. **Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.** 35 : 127-340. 1978.

GOODMAN, G.A., RALL,T.W.,NIES, A.S.,TAYLOR, P. **Las bases farmacológicas de la terapeutica**. Panamericana, Mexico, 1751 p., 1991.

GRAYDON, R. J., HAMID, H., ZAHARI, P., GARDINER,C. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. **Aust. Vet. J.**, v. 68, n. 7, p. 234-236, 1991.

GUITERREZ, M., FORSTER, F.I., MC CONELL,S.A.,CASSIDY,J.P., POLLOCK, J.M., BRYSON, D.G. The detection of CD2,CD4,CD8, and WCI T lymphocytes ,B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.321-334,1999.

HALDER, C.A., TABER, R.A., CAMP, B.J. Absence of sporidesmin by twelve Texas isolates of *Pithomyces* spp. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 41 n 1 p. 212-215, 1981.

HENRICA, M. Comparative study on the content os starch and sugars of *Tribulus terrestris*, *Lucerb* ans some graminaeae and *Pentzia incana* under different metereological, edaphic, and physiological conditions. Carbohydrate nutrition **Onderstepoort. J. Vet. Res.**, v.25, p.45-92,1952.

HENSEN,D.E., McCOY, R.D., HEDSTROM, O.R., SNYDER, S.P., BALLERSTEDT, P.B. Photosensitization associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 204, n. 10, p. 1668-1671, 1994.

HOLLAND, P.T., MILES, C.O., MORTIMER, P.H., WILKINS, A.L., HAWKES, A.D., SMITH, B.L. Isolation of steroidal saponin epismilagenin from the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. **J. Agric. Food Chem.** n. 39, p. 1963-1965, 1991.

HOOGSTEDEN, H. C., VAN HAL, P. T., WIJKHUIJS, J. M., HOP, W., HILVERING, C. Differences in expression of monocyte/macrophage surface antigens in peripheral blood and bronchoalveolar lavage cells in interstitial lung diseases. **Lung**, v.171, n.3, p.149-160, 1999.

HORE, D.E. Facial eczema. **Aust. Vet. J.**, v. 36, p. 172-176, 1960.

HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. **Chemistry and Pharmacology of natural products: saponins**. Cambridge University Press, New York, 548p., 1995.

HOUSE, J.K., GEORGE, L.W., OSLUND, K.L., GALEY, F.D., STANNARD, A.W., KOCH, L.M. Primary photosensitization related to ingestion of alfalfa silage by cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 209, n. 9, p. 1604-1607, 1996.

HOWARD, D.R., BATSAKIS, J.B. Peanut agglutinin: a new marker for tissue histiocytes. **Am. J. Clin. Pathol.** v.77, p. 401-408, 1982.

HU, K., KOBAYASHI, H., DONG, A., JING, Y., IWASAKI, S., YAO, X. Antineoplastic agents II: Steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. **Planta medica.**, n. 65, p. 35-38, 1999.

HUTTON, E.M., Report on *Brachiaria decumbens* problem on Fazenda São Tomás Abóbora of Carlos Cunha, Rio Verde, Goiás, visited August 15, 1975. IPB Comércio de sementes Ltda. 3 p. (**datilografado**), 1975.

IULANO, L. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. **Lipids**.v.36, suppl. 41-44, 2001.

JOHNSON, I.T., GEE, J.M., PRICE, K., CURL, C., FENWICK, G.R. Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. **J Nutr.**, v.116, p.2270-2277, 1986.

JUTILA, M. A., BERG, E. L., KROESE, F.G., ROTT, L., PERRY, V., BUTCHER, E.C. In vivo distribution and characterization of two novel mononuclear phagocyte differentiation antigens in mice. **J Leukoc Biol**, v. 54, n.1, p.30-91, 1993

KELLERMAN, T.S., VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A., COETZER, J.A.W., ROUX, C., MARASAS, W.F.O., MINNE, J.A., BATH, G.F., BASSON, P.A. Photosensitivity in South Africa. II - The experimental production of the ovine hepatogenous photosensitivity disease geeldikkop (*tribulosis ovis*) by simultaneous ingestion of *Tribulus terrestris* plants and cultures of *Pithomyces chartarum* containing the mycotoxin sporidesmin. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 47, p. 231-261, 1980.

KELLERMAN, T.S., COETZER, J.A.W. Hepatogenous photosensitivity diseases in South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.** v. 52, p. 157-173, 1985.

KELLERMAN, T.S., ERASMUS, G.L., COETZER, J.A.W., BROWN, J.M.M., MAARTENS, B.P. Photosensitivity in South Africa. VI - The experimental induction of geeldikkop in sheep with crude steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, n. 58 p. 47-53, 1991.

KELLY, W.R. The liver and biliary system. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. Pathology of domestic animals. V. 2, Academic Press, Orlando, 1993.

KOSTOVA, I., DINCHEV, D., RENTSCH, G.H., DIMITROV, V., IVANOVA, A. Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. **Planta Med.**, v.66, n.6, p.545-50, 2000.

LANCASTER, M.J., VIT, I., LYFORD, R.L. Analysis of bile crystals from sheep grazing *Panicum schinzii*. **Aust. Vet. J.**, v. 68, n. 8, p. 241, 1991.

LEMOS, R.A.A., FERREIRA, L.C.L., SALVADOR, S. C., NAKAZATO, L. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. In: [I ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL], **Anais**, Campo Grande, p. 41-43, 1996a.

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, n. 1, p. 109-113, 1996b.

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, n. 6, 1997.

LEMOS, R.A.A., NAKAZATO, L., HERRERO JUNIOR, G.O., SILVEIRA, A.C., PORFIRIO, 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, n. 3, p. 507-510, 1998.

LOW, S.G., BRYDEN, W.L., JEPHCOTT, S.B., GRANT, I.M.C.L. Photosensitization of cattle grazing signal grass (*Brachiaria decumbens*) in Papua New Guinea. **N. Z. Vet. J.**, v. 41, n. 4, p. 220-221, 1993.

MALAVOLTA, V.M.A., AMARAL, R.E.M., RIPINSKAS, O.M. Plantas hospedeiras e distribuição geográfica do fungo *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M.B. Ellis no Brasil. **O Biológico**, v. 46, n. 3-4, p. 59-76, 1980.

MARASAS, W.F.O., ADELAAR, T.F., KELLERMAN, T.S., MINNE, J.A., van RENSBURG, I.B.J., BURROUGHS, G.W. First report of facial eczema in sheep in South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, n. 39, p. 107-112, 1972.

MARASAS, W.F.O., KELLERMAN, T.S. Photosensitivity in cattle. p. 73-84. In: WYLIE, T.D. & MOREHOUSE, L.G. (ed) **Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicosis. An encyclopedic handbook**. Vol. II Marcel Dekker, New York, 1978.

MATHEWS, J.P. Lecheguilla poisoning in sheep, goats and laboratory animals. **Texas Agri Expt.St Bull**, n.554, 1937.

MAZNI, O.A., SHARIF, H., KHUSAHRY, M.Y.M., VANCE, H.N. Photosensitization in goats grazed on *Brachiaria decumbens*. **Mardi Res. Bull.**, v. 13, n. 2, p. 203-206, 1985.

McCARTHY, P.H. Facial lesions of horses in central Queensland correlated with recent rains. **Aust. Vet. J.**, v.36 , p.242-243, 1960.

MEAGHER, L.P., WILKINS, A.L., MILES, C.O., COLLIN, R.G., FAGLIARI, J.J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *B. decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Vet. Hum. Toxicol.** v. 38, n. 4, p. 271-274, 1996.

MEAGHER, L.P., SMITH, B.L., WILKINS, A.L. Metabolism of diosgenin-derived saponins: implications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminants. **Anim. Feed. Sci. Technol.**, v.91, n.3-4, p.157-170, 2001.

MENNA, M.E. di, CAMPBELL, J., MORTIMER, P.H. Sporidesmin production and sporulation in *Pithomyces chartarum*. **J. Gen Microbiol.**, n. 61, p. 87-96, 1970.

MENNA, M.E. Di. Facial Eczema, 2- Warning Systems. In: [RUAKURA FARMER'S CONFERENCE]. **New Zealand, Proceedings**, p. 50-54, 1973.

MILES, C.O. A role for steroidal saponins in hepatogenous photosensitization. **N. Z. Vet J.**, v. 41, n. 4, p. 221, 1993.

MILES, C.O., WILKINS, A.L., MUNDAY, S.C., FLAOYEN, A., HOLLAND, P.T., SMITH, B.L. Identification of insoluble salts of the (-D-Glucuronides of Epissarsasapogenin and Epismilagenin in the bile of lambs with alveld and examination of *Nartheicum ossifragum*, *Tribulus terrestris*, and *Panicum miliaceum* for sapogenins. **J Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 6 p. 914-917 , 1993.

MILES, C.O., WILKINS, A.L., ERASMUS, G.L., KELLERMAN, T.S., COETZER, J.A.W. Photosensitivity in South Africa. VII. Chemical composition of biliary crystals from a sheep with experimentally induced geeldikkop. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 61, p. 215-222, 1994.

MIMAKI, Y., YOKOSUKA, A., KURODA, M., SASHIDA, Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. **Biol. Pharm. Bull.**, n. 24, p. 1286-1289, 2001.

MISKOVSKY, P. Hypericin: a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. **Curr Drug Targets**, v.3, n. 1, p.55-84, 2002.

MIYAMOTO, M., MANABE, N., KURAMITUSI, K., KURIBAYASHI, Y., TAMURAK, FURUYA, Y., NAGANO, N., FUKUMOTO, M., MIYAMOTO, H. Lectin histochemistry in rat liver fibrosis induced by heterologous serum sensitization. **J. Vet. Med. Sci.** v.59, n. 8, p.681-687, 1997.

MONLUX, A.W., GLENN, B.L., PANCIERA, R.J., CORCORAN, J.B. Bovine hepatogenous photosensitivity associated with the feeding of alfalfa hay. **J. Am. Vet. Assoc.**, v. 142, n. 9, p. 989-994, 1963.

MONTEIRO, M.C.C., LUCAS, E.D., SOUTO, S.M. Estudo de seis espécies do gênero *Brachiaria* **Pesq. Agropec. Bras. , Sér. Zootéc.**, v. 9, p. 17-20, 1974.

MORTIMER, P.H., TAYLOR, A. The Experimental Intoxication of Sheep with Sporidesmin, a Metabolic Product of *Pithomyces chartarum* **Res. Vet Sci.**, n. 3, p. 147-160, 1962.

MORTIMER, P.H. The Experimental intoxication of sheep with sporidesmin, a metabolic product of *Pithomyces chartarum* **Res. Vet. Sci.**, v. 4, p. 166-185, 1963.

MORTIMER, P.H., MENNA, M.E., WHITE, E.P. Pithomycotoxicosis, "facial eczema" in cattle. In: WYLLIE, T.D., MOREHOUSE, L.G. **Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses.** Marcel Dekker, New York, p. 63-72, 1978

NAZÁRIO, W., AMARAL, R.E.M., FERNANDES, N.S., CAMARGO, W.V.A., SANTIAGO, A.M.H., CARVALHO NETO, C. Ocorrência do *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M.B. Ellis em alimentos destinados a eqüinos com eczema facial. **O Biológico**, v. 41, n. 12, p. 359-360, 1975.

NAZÁRIO, W., AMARAL, R.E.M., ANGELI, V.M., CAPPELLARO, C.E.M.P.D.M., FERNANDES, N.S., CAMARGO, W.V.A.. Intoxicação experimental produzida pelo *Pithomyces chartarum* (Berk & Curt) M.B. Ellis, isolado de *Brachiaria decumbens*. **O Biológico**, n. 43(5,6), p. 125-131, 1977.

NAZÁRIO, W., MANDORINO, I., MALAVOLTA, V.A., DUPAS, W., WEYAND, S.C. Fotossensibilização em ovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrad, no Estado de São Paulo, com provável participação do fungo *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M.B. Ellis. (Nota prévia). **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 7, n. 7, p. 216-218, 1985.

NDAMBA J, LEMMICH E, MOLGAARD P Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**. Jan; 35(1):95-9 1994.

NIKI, T., OKA, T., SHIGA, J., MACHINAMI, R. Kupffer cells in multiple organ failure--their activation as revealed by immunohistochemistry for lysozyme, alpha 1-antichymotrypsin, and lectins, **Gen. Diagn. Pathol.**, v. 141, n.1, p. 21-7, 1995.

NOBRE, D., ANDRADE, S.O. Relação entre fotossensibilização em bovinos jovens e a gramínea *Brachiaria decumbens* Stapf. **O Biológico**, v. 42, n. 11-12, p. 249-258, 1976.

NOORDIN, M. M., ABDULLAH, A.S., RAJION, M.A. Experimental *Brachiaria decumbens* toxicity in cattle. **Vet. Res. Commun.**, v. 13, p. 491-494, 1989.

OPASINA, B.A. Photosensitization Jaundice Syndrome in West African Dwarf sheep and goats grazed on *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, v. 19, n. 3, 1985.

PARRAS, R., VIVAS, N. Instalación y manejos de praderas en el pie de monte llanero. Bogotá, Instituto Colombiano Agropecuario. **Boletín de divulgación**, n .50, p.1-27, 1974.

PATAMALAI, B., HEJTMANCIK, E., BRIDGES, C.H., HILL, D.W., CAMP, B.J. The isolation and identification of steroidal sapogenins in Kleingrass. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 32, n. 4, p. 314-318, 1990.

PATHAK, M.A., FITZPATRICK, T.B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA. 2000 BC to 1992 AD. **J. Photochem. Photobiol.**, v.14, n.1-2, p. 3-22, 1992.

PAULINO, V.T., ANTON, D.P., COLOZZA, M.T. Problemas nutricionais do gênero *Brachiaria* e algumas relações com o comportamento animal. **Zootecnia**, n.25, p.215-263, 1987.

PIER, A.C. An overview of mycotoxicosis of domestic animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.163, p.1259-1261, 1973.

PLUMLEE, K. H. Photosensitization in ruminants. **Food An. Prac.**, v. 5, p.605-612, 1995.

PRICE, K.R., JOHNSON, I.T., FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance in foods and feeding stuffs. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v.26, n.1, p.127-135, 1987.

PURCHIO, A., CORREA, B., GALHARDO, M., PELICCI, P. Ocorrência de surto de eczema facial em ovinos na região de São Manuel, estado de São Paulo. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo.**, v. 25, n. 1, p. 135-141, 1988.

RAO, I. M., ZEIGLER, R. S., VERA, R., SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bio Science**, v. 43, p. 454- 465, 1993.

REE, H.J., KADIN, M. E. Macrophage-histiocytes in Hodgkin's disease. The relation of peanut-agglutinin-binding macrophage-histiocytes to clinicopathologic presentation and course of disease. **Cancer**, v. 56, n. 2, p. 333-338, 1985.

RIET ALVARIZA, R., DIAS, L. El hongo *Pithomyces chartarum* asociado com casos de fotosensibilizacion hepatogena en bovinos. In: [II JORNADAS URUGUAIAS DE BUIATRIA], **anais**, Paysandú, Uruguai, p. 1-9, 1974.

RIET ALVARIZA, F., PERDOMO, E., CORBO, M., BERIAO, J., PEÑA, PARADA L de La, MICHELENA, E., QUADRELLI, J.C., ALZUGARAY, I. Nuevos casos de fotossensibilizacion hepatogena producidos por "el hongo de la pradera" *Pithomyces chartarum* (BERK & CURT) M.B. ELLIS In: [II JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA]. **Anais**, Paysandú, Uruguai, p.1-11, 1977.

RIET-CORREA, F., SCHILD A.L., MÉNDEZ, M.C. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Editora Gráfica, UFPel, Pelotas 658p., 1998.

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.

ROWLAND, I., WISEMAN, H., SANDERS, T., ADLERCREUTZ, H., BOWEY, E. Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. **Biochem. Soc. Trans.**, v.27, n. 20, p.304-308, 1999.

SATTI, M.B., MELHA, A.A., AL-SOHAIBANI M.O., AL-SOWAYAN, S., AL-QUORAIN, A., IBRAHIM, E.M. Splenic foam cells: a clinico-pathologic analysis of 92 splenectomized patients. **Acta Haematol.**, v.1, n. 83, p.9-15, 1990.

SCHENK, M.A.M., SCHENK, J.A.P. Estudo de fotossensibilização hepatógena em bezerros em pastagem de *Brachiaria decumbens* cv. australiana. **Somvtap em revista**, v. 2, n. 5, p. 7-8, 1981.

SILVA, L.B., Alterações hepáticas em bovinos acometidos de doença periodontal, (cara inchada). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 27 p., 1989.

SIMPSON, J.W., ELSE, R.W. Diagnostic value of tissue biopsy in gastrointestinal and liver disease. **Vet. Rec.**, v. 120, p. 230-233, 1987.

SMITH, B.L., MILES, C.O. A role for *Brachiaria decumbens* in hepatogenous photosensitization of ruminants. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 35, n. 3, p. 256-257, 1993.

TABER, R.A., PETTIT, R.E., TABER, W.A., DILLAHITE, J.N. Isolation of *Pithomyces chartarum* in Texas. **Mycology**, v. 60, p. 727-730, 1968.

TEMPERINI, J.A., BARROS, M.A. Revisão sobre aspectos químicos e físicos ligados ao fenômeno de fotossensibilização e efeitos biológicos da esporidesmina obtida do fungo *Pithomyces chartarum* (BERK & CURT) M.B. ELLIS **O Biológico**, v. 43, n. 5-6, p. 103-110, 1977.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Helianthus, Rio de Janeiro, 309p., 2000.

TODD, R.F., SCHLOSSMAN, S.F. Analysis of antigenic determinants on human monocytes and macrophages. **Blood**, v. 59, n.4, p. 775-186, 1982.

TRAN, Q.L., TEZUKA, Y., BANSKOTA, A.H., TRAN, Q.K., SAIKI, I., KADOTA, S. New spirostanol steroids and steroidal saponins from roots and rhizomes of *Dracaena angustifolia* and their antiproliferative activity. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n.9, p.1127-32, 2001.

VIVAS, N., PARRAS, R. Pasto *Brachiaria* o pasto peludo (*Brachiaria decumbens* Stapf.). Villavicencio, Instituto Colombiano Agropecuario. Programa de Pastos y Forrajes, p. 1-32, (mimeografado), 1975.

WATANABE, T., HATTORI, F., TANAKA, K. An experimental study on the origin of foam cells in glomerulonephritis. **Acta Pathol Jpn.**, v.32, n.3, p.371-383, 1982.

WEISS, E. Haut. Physikalisch bedingte Hautentzündungen, p. 437-480. In: JOEST, E. **Handbuch der pathologischen Anatomie der Haustiere**. Band IV. 3 Aufl. Paul Parey, Berlin, 1962.

WHILLIAMS, M.C. The pathology of experimental *Lasiospermum bipinnatum* (Thunb) Druce (Asteraceae) poisoning in sheep. 2. Pulmonary and miscellaneous lesions. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 57, p. 263-268, 1990.

WHITE, E.P., MORTIMER, P.H., MENNA, M.E. di. Chemistry of the sporidesmins. In: WYLLIE, T.D., MOREHOUSE, L.G. **Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses**. Marcel Decker, New York, p.427-447, 1977.

XU Y X., CHEN H S., LIANG H Q., GU Z.B., LIU W. Y., LEUNG W.N., LI, T.J. Three new saponins from *Tribulus terrestris*. *Planta Med.* V. 66 n. 6 p. 545-550, 2000.

YAGER, J.A., SCOTT, D.W. The skin and appendages – Actinic diseases of skin. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. **Pathology of domestic animals General Pathology**. Academic Press, New York, **Orlando, Fla.**, p. 592-597, 1993.

ZAMRI-SAAD, M., SHARIF, H., MAZNI, O. A. Pathological changes in indigenous sheep of Malaysia following grazing on *Brachiaria decumbens*. **Kajian Veterinar**, v. 19, n. 1, p. 9-12, 1987.

ABSTRACT

Characteristics of the foamy cells in liver, mesenteric lymph nodes and intestine from bovines associated to the consumption of *Brachiaria* spp.

Author: María Soledad Gomar

Adviser: David Driemeier

Fragments of the liver, hepatic and mesenteric lymph nodes, and the intestines of a group of 100 3-4 year-old Nellore bullocks, originated from Mato Grosso State were studied. These animals had been grazing on *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*. Macroscopically, the livers were yellow even after being fixed in formalin. This aspect was not observed on the livers of control cattle that were grazing on other grasses. The parenchyma of the lymph nodes showed whitish and striated areas. These findings were more evident in the hepatic lymph nodes. The histological alterations included foamy macrophages in the livers, in the hepatic and mesenteric lymph nodes and in the submucosa of the intestines. The tissues which presented these foamy cells were processed through histochemical, lectin histochemical and immunohistochemical studies, especially to characterize the contents of those cells. On Perls stain the foamy cells of the lymph nodes had blue cytoplasm and the presence of ferric salt deposits was pronounced, possibly due to the phagocytosis of effete erythrocytes. Under the immunohistochemical analysis, the marker for macrophages, antibody Mac 387 has not marked the foamy cells. By lectin histochemistry, it has been observed that the lectin PNA may work as marker for foamy cells due to its high affinity and specificity to those cells. Isolated foamy cells, which could not be seen through other staining methods. Furthermore, the PNA lectin demonstrated specificity to macrophages adding evidence to the hypothesis that the foamy cells are macrophages. When assessing the pattern of affinity of the lectin, it has been demonstrated that there probably are changes in the composition of the glycidic in the cattle fed on *Brachiaria* compared to those which were not fed on this grass.