



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação
por *Brachiaria spp.* em ovinos.**

CRISTIANE VINHAES GRACINDO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA-DF
DEZEMBRO/ 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação
por *Brachiaria spp.* em ovinos.**

CRISTIANE VINHAES GRACINDO

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 118D/2014

BRASÍLIA-DF
DEZEMBRO/ 2014

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

GRACINDO, C. V. **Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 62p. Tese de Doutorado.

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1019146.

Gracindo, Cristiane Vinhaes
G731 i Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação
 por *Brachiaria* spp. em ovinos./ Cristiane Vinhaes
Gracindo. - - 2014
 62 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Márcio Botelho de Castro.

1. Ovino - Doenças. 2. Capim- braquiária 3. Intoxicação.
I. Castro, Márcio Botelho de. II. Título.

CDU 636. 32/ . 38



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação por
Brachiaria spp. em ovinos.**

CRISTIANE VINHAES GRACINDO

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Edson Moleta Colodel. UFMT.

Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos. UFMS.

Prof. Dra. Giane Regina Paludo. Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Sérgio Lúcio Salomon Cabral Filho. Universidade de Brasília.

BRASÍLIA, 04 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente meu orientador e amigo prof. Márcio pelos ensinamentos, incentivo, apoio e amizade.

Ao Sr. Francisco pelo apoio, carinho e confiança. O sr. tem um lugar especial no meu coração!

Ao prof. Sérgio Cabral Filho e ao amigo Helvécio Santos Jr. pelo carinhoso auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao prof. Franklin Riet-Correa pelo grande apoio durante todo o processo que envolveu o doutorado.

Aos meus irmãos Gustavo e Felipe, presentes que Deus me deu! Às minhas queridas cunhadas Ângela e Luciana, minha princesa Isabele e meu príncipe Guilherme. Amo vocês! Às tias Rosane e Jane pelas alegrias.

Ao meu amor pelo imenso apoio, paciência e estímulo. Ter você ao meu lado foi essencial para esta conquista. Obrigada por iluminar meu caminho.

À minha mãe por tudo! Mãe, você é uma lição de vida e de sucesso! Devo a você ser quem eu sou. Quero um dia conseguir ser um pouquinho da profissional que você é. Tenho muito orgulho de ser sua filha.

Ao meu saudoso pai, meu herói, minha a inspiração. Ao meu saudoso Arthus, que me ensinou o significado do amor incondicional. À minha avó Rosa fonte de tantos sonhos.

À Deus e Nossa Senhora pelas oportunidades, pelas incontáveis bênçãos e pela vida!

Agradeço o importante apoio financeiro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o Controle das Intoxicações por Plantas (Proc. CNPq 573534/2008-0). Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

Capítulos	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
CAPÍTULO I	
1. Introdução	11
2. Referencial teórico	12
2.1. <i>Brachiaria</i> spp.	12
2.2. Etiopatogenia	13
2.3. Fatores de suscetibilidade e resistência	14
2.4. Manifestações clínicas	15
2.5. Patologia clínica	17
2.6. Detoxicação hepática	18
2.7. Adaptação e manejo	20
2.8. Transfaunação	23
2.9. Herdabilidade	25
2.10. Controle e profilaxia	25
3. Objetivos	26
4. Referências	27
CAPÍTULO II	
1. Artigo: Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação por <i>Brachiaria</i> spp. em ovinos.	38
Anexos	53

RESUMO

Brachiaria spp. é a planta tóxica mais importante no Brasil Central devido a presença de saponina esteroidal que promove intoxicação hepatógena em animais, que leva a ineficiência produtiva, fotossensibilização e morte. A toxicidade da *Brachiaria* spp. depende de fatores relacionados à susceptibilidade/resistência dos animais e de fatores intrínsecos da planta, conferindo diferenças significativas na manifestação clínica e mortalidade dos rebanhos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. O presente trabalho investigou as formas de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos por meio de três experimentos concomitantes. No primeiro experimento foi realizado o manejo adaptativo através da exposição controlada de ovinos em pastagens de *Brachiaria* spp. Foi demonstrada que a exposição dos animais à *B. decumbens* por 2 horas por dia ou em dias alternados foi capaz de proteger os animais da intoxicação durante o desafio. No experimento 2, a utilização da transfaunação ruminal foi demonstrada como uma possibilidade para transferir a resistência à intoxicação pela gramínea para animais susceptíveis. No terceiro experimento, cordeiros provenientes de matrizes oriundas de rebanhos susceptíveis, apresentaram maior morbidade à intoxicação que cordeiros de plantéis adaptados ao pastejo em *Brachiaria* spp. O conjunto de resultados dos experimentos permite sugerir que o controle do tempo de acesso aos piquetes de *Brachiaria* spp., aliado ao processo de transfaunação, podem ser alternativas viáveis para prevenir a intoxicação pela gramínea em ovinos enquanto os animais são jovens, período de maior susceptibilidade a desenvolverem toxicidade.

Palavras chaves: *Brachiaria decumbens*, saponina, manejo adaptativo, transfaunação, resistência.

ABSTRACT

Brachiaria spp. are the most important toxic plant in central-western Brazil due to the presence of steroidal saponins, cause hepatogenous poisoning in animals, leading to production inefficiencies, photosensitization and death. The toxicity of *Brachiaria* spp. depends on factors related to susceptibility / resistance of animals and intrinsic factors of the plant, providing significant differences in clinical presentation and mortality of livestock grazing the plant. The present study investigated the forms of resistance to *Brachiaria* spp. poisoning in sheep through three simultaneous experiments. The first experiment, the adaptive management, was performed by controlled exposure of sheep grazing *Brachiaria* spp. It was demonstrated that exposure of animals to *B. decumbens* for 2 hours a day or on alternate days was able to protect animals from poisoning during the challenge. In experiment 2, the use of rumen transfaunation was demonstrated as a possibility to transfer the resistance to poisoning by the grass to susceptible animals. In the third experiment, lambs originated from livestock susceptible to poisoning had higher morbidity than flocks of lambs adapted to grazing on *Brachiaria* spp. The set of results of the experiments suggest that the control of access to the paddocks of *Brachiaria* spp., allied to transfaunation process can be a viable alternative to prevent poisoning in sheep by the grass while the animals are young.

Keys words: *Brachiaria decumbens*, saponin, adaptive management, rumen transfaunation, resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Lesões de fotossensibilização na face (A) e membro torácico (B) em ovino submetido ao pastejo contínuo em <i>Brachiaria decumbens</i> no Experimento 1 - Brasília, 2012.	53
Figura 2. Taxas séricas médios de GGT (A) e AST (B) de ovinos submetidos ao pastejo em <i>Brachiaria decumbens</i> por duas horas diárias (BD2h), pastejo em dias alternados <i>Brachiaria decumbens</i> (BDalt), pastejo contínuo em <i>Brachiaria decumbens</i> (BDc), pastejo contínuo em <i>Brachiaria humidicula</i> (BHc), e pastejo contínuo em <i>Brachiaria brizantha</i> (BBc) durante o Experimento 1. Valor máximo de referência da população (VMRP) para espécie. - Brasília, 2012.	44
Figura 3. Hepatócitos vacuolizados e presença de macrófagos espumosos (seta). Fígado de ovino intoxicado após duas semanas de pastejo contínuo em <i>Brachiaria decumbens</i> . HE, obj. 40x.	53
Figura 4. Taxas séricas médios de GGT e AST de cordeiros suscetíveis (CRS) e adaptados (CRA) submetidos ao pastejo em <i>Brachiaria decumbens</i> durante o Experimento 3. - Brasília, 2012.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Formas de manejo estabelecidos de acordo com os grupos no Experimento 1 - Brasília, 2012.	42
Tabela 2. Atividade bioquímica sérica média dos grupos durante a fase de desafio no Experimento 2 - Brasília, 2012.	45

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A alta taxa de adaptabilidade em variadas condições de solo e clima, obtendo vantagens sobre outras espécies de forrageiras, fez com que a *Brachiaria spp.* ocupasse espaços cada vez maiores, constituindo hoje a base da alimentação de uma considerável fração do rebanho brasileiro (BAUER et al. 2008), especialmente no cerrado (DIAS et al. 2004, VIANA & BORGES 2006). Contudo, a utilização desses pastos tem sido um obstáculo à criação de ovinos, por produzir intoxicação hepatógena, levando os animais a fotossensibilização e morte (CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011).

A ocorrência de surtos de intoxicação e morte de ovinos, caprinos e bovinos ocorre desde a introdução de *Brachiaria spp.* no país (ANDRADE et al. 1975, TOKARNIA et al. 1979, TOKARNIA et al. 2000). Os ovinos são mais sensíveis aos efeitos tóxicos da *Brachiaria spp.* (LEMOS et al. 1998).

A intoxicação de animais por plantas gera perdas diretas e indiretas. As perdas diretas provocadas por mortes de animais, diminuição dos índices reprodutivos e da produtividade, e outras doenças transitórias, enfermidades subclínicas e aumento da susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica. As perdas indiretas incluem os custos de controlar as plantas tóxicas nas pastagens, medidas de manejo para evitar as intoxicações, redução do valor da forragem e do valor da terra, gastos com substituição de animais mortos e com diagnóstico e tratamento dos animais intoxicados (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001).

Apesar da vasta literatura acerca de intoxicações por plantas em ruminantes, entre elas *Brachiaria* spp., não existe nenhum programa com objetivo de controlar e minimizar as perdas ocasionadas por esse problema (RISSI et al. 2007) e pouco se conhece sobre adaptação e sensibilidade de animais, bem como, formas seguras de utilização de *Brachiaria* spp. (CASTRO et al. 2011).

Nesse sentido, estudos que visam identificar os mecanismos de adaptação de rebanhos a *Brachiaria* spp., são de imenso valor ao desenvolvimento da produção de animais e em especial da ovinocultura.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Brachiaria* spp.

Diversas espécies do gênero *Brachiaria* são utilizadas como forrageiras no Brasil. *B. decumbens* cv. IPEAN foi introduzida no Brasil em 1952. *B. decumbens* cv. Basilisk foi introduzida no país em 1972 oriunda da Austrália e se popularizou rapidamente pelas regiões Centro-Oeste, Norte e Sul do Brasil. As gramíneas *B. brizantha*, introduzida no país em 1980, e *B. humidicola*, em 1973, têm sido amplamente aceitas em substituição a *B. decumbens* devido à sua tolerância ao ataque de cigarrinhas (família Cercopidae), que atinge severamente as pastagens (SEIFFERT 1980, RIET-CORREA et al. 2011).

A maior parte dos surtos são descritos em pastagem de *B. decumbens* (LEMOS et al. 1996, 1998, BRUM et al. 2007, MENDONÇA et al. 2008) e *B. brizantha* (MACÊDO et al. 2008, RISSI et al. 2011). A intoxicação em outras espécies do gênero *Brachiaria* é rara, com descrição de surtos isolados em *B. humidicola* e *B. ruziziensis* (RIET-CORREA et al. 2011).

A intoxicação por *Brachiaria* spp. pode ocorrer durante qualquer época do ano (SIQUEIRA-SOUZA et al. 2005), contudo, a ocorrência de fotossensibilização hepatógena em bovinos ocorre, principalmente, no outono (março a maio) e na primavera (setembro a novembro) (SCHILD 2007). Portanto, a toxidez das plantas não é uniforme, ao contrário, apresenta variações de acordo com a época do ano, condições de administração e outras variáveis ainda pouco esclarecidas (TOKARNIA

et al. 2000, RIET-CORREA & MEDEIROS 2001, ZHANG et al. 2001, SILVA et al. 2006, BRUM et al. 2007).

Os primeiros relatos associados à intoxicação experimental por *B. decumbens* descrevem morbidade e mortalidade de 100% de ovinos (ANDRADE et al. 1975). Ainda hoje, a intoxicação pela planta é caracterizada por elevada morbidade, mortalidade e letalidade (MUSTAFA et al. 2012).

2.2. Etiopatogenia

Inicialmente a micotoxina esporidesmina, produzida pelo fungo saprófito *Pithomyces chartarum*, foi apontado como agente responsável pela fotossensibilização em animais (ANDRADE et al. 1975). Contudo, outras análises demonstram que, mesmo na ausência de esporos no pasto, alguns animais apresentam as mesmas lesões associadas à fotossensibilização, e sugerem outra etiologia para intoxicação por *Brachiaria* spp. (LEMOS et al. 1996, 1998, DRIEMEIER et al. 1998, TOKARNIA 2000, BRUM et al. 2007).

Os primeiros relatos acerca da toxicidade das braquiárias, pela presença de saponinas esteroidais, foram observados em ovinos que pastejavam *B. decumbens*, apresentaram alterações na motilidade e pH ruminal e fotossensibilização, sinais atribuídos a compostos hepatotóxicos da planta (SALAM ABDULLAH et al. 1988). Alguns relatos demonstraram a presença destas substâncias em amostras de capim, conteúdo de vesícula biliar (CRUZ et al. 2000, DRIEMEIER et al. 2002) e em extratos purificados de conteúdo ruminal de ovinos (SALAM ABDULLAH et al. 1992, CRUZ et al. 2000, LAJIS et al. 1993).

A análise de animais intoxicados por *Panicum* spp. e *Tribulus terrestris* levaram a identificação de saponina esteroidal litogênica (DRIEMEIER et al. 1998, MOTTA et al. 2000, LEMOS et al. 2002), agente causal da fotossensibilização hepatógena (DRIEMEIER et al. 1999, RIET-CORREA & MEDEIROS 2001). Metabólitos derivados das saponinas foram identificados no conteúdo ruminal de ovinos com fotossensibilização submetidos ao pastejo em *B. decumbens* (SALLAM ABDULLAH et al. 1992, LAJIS et al. 1993).

Saponinas esteroidais são glicosídeos presentes na *Brachiaria* spp. compostos de parte lipofílica, denominada aglicona ou sapogenina (CRUZ et al. 2000), e parte hidrofílica formada por cadeias de açúcares. Esta estrutura permite a formação de

espuma persistente e abundante quando em solução aquosa, propriedade de onde se deriva o nome (SANTOS 2000).

A hidrólise de saponinas pelo trato digestório dos animais, dá origem às sapogeninas epismilagenina e episarsasapogenina. A formação de cristais biliares envolve redução da dupla ligação do radical 3- β -OH para 3- α -OH e posterior conjugação com o ácido glicurônico, que se ligam com os íons de cálcio e formam sais insolúveis que se depositam nos ductos biliares na forma de cristais biliares (MILES et al. 1991, 1994, SANTOS et al. 2008).

Os cristais são transportados pela circulação linfática que geram inflamação e obstrução do sistema biliar, além de necrose dos hepatócitos periportais resultando em icterícia, fotossensibilização e hepatite, causados pelo bloqueio físico ao fluxo da bile (DRIEMEIER et al. 1998, LEMOS et al. 1998, SANTOS et al. 2008).

Pastejo em *Brachiaria* spp. durante a brotação, ou em pastagens vedadas, maduras, por um período superior a 30 dias, são relatados como pastos de maior toxicidade, nestes casos a doença é mais grave e acomete animais de todas as idades (LEMOS et al. 1996, BRUM et al. 2007, CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011, GRACINDO et al. 2014, LIMA et al. 2012).

2.3. Fatores de suscetibilidade e resistência

A toxicidade da *Brachiaria* spp. depende de fatores relacionados à susceptibilidade/resistência dos animais e de fatores intrínsecos da planta, conferindo diferenças significativas na manifestação clínica e mortalidade dos rebanhos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. (CASTRO et al. 2011). O termo resistência é utilizado para designar a habilidade do animal em modular determinada doença e suas consequências. Resiliência, relacionada a tolerância, define habilidade do animal em manter performance quando desafiado por doença (BISHOP & MORRIS 2007).

Animais jovens demonstram maior susceptibilidade do que os adultos à intoxicação por *Brachiaria* spp. (LEMOS et al. 1997, SANTOS et al. 2008, CASTRO et al. 2011), e animais que nunca entraram em contato com *Brachiaria* spp., são mais suscetíveis à manifestação de sinais de intoxicação, e podem apresentar quadro clínico mais grave da enfermidade (SANTOS et al. 2008, CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011).

Foi sugerido que os animais que pastejam em *Brachiaria* spp. por anos, ou que são oriundos de rebanhos com este hábito de pastagem, resistem melhor ou não demonstram qualquer sinal de intoxicação. Esse mecanismo de resistência à intoxicação, apresentado por animais adaptados, ainda não foi esclarecido, porém alguns autores sugerem que ele possa ocorrer em decorrência a uma seleção natural de animais resistentes ao longo dos anos ou uma característica transmitida de forma hereditária (FLAOYEN et al. 2001, CASTRO et al. 2011).

2.4. Manifestações clínicas

A ocorrência de surtos de intoxicação e morte de ovinos, caprinos e bovinos vem sendo observada desde a introdução de *Brachiaria* spp. no país (ANDRADE et al. 1975, TOKARNIA et al. 1979). Os ovinos são considerados como uma das espécies mais sensíveis aos efeitos tóxicos da *Brachiaria* spp. (LEMOS et al. 1998, CASTRO et al. 2011). O período entre a ingestão da planta e o aparecimento dos sinais clínicos pode ser bastante variável, podendo ser compreendido entre poucos dias a meses (LEMOS et al. 1996, BRUM et al. 2007).

Nas manifestações clínicas de intoxicação por ingestão de *Brachiaria* spp., destacam-se: fotofobia, apatia ou inquietação, diminuição do apetite e emagrecimento, lesões cutâneas alopecicas, eritematosas, ulceradas, necróticas e disseminadas por toda extensão tegumentar, especialmente nas áreas de pele despigmentadas e desprovidas de pelo, eritema, edema subcutâneo generalizado, vesícula biliar distendida e obstruída, icterícia, padrão lobular evidente e hepatomegalia (LEMOS et al. 1996, DRIEMEIER et al. 1998, TOKARNIA et al. 2000, MOTTA et al. 2000, SATURNINO et al. 2010, BARBOSA et al. 2006, BRUM et al. 2007, SALA et al. 2007).

O edema de face e orelha, assim como o eczema facial, são descritos exclusivamente em ovinos intoxicados pela forrageira (SALLAM ABDULLAH et al. 1992). Nesses casos, o pavilhão auricular tem apresentação contorcida com os bordos voltados para cima, presença de ulcerações na parte ventral da língua, ceratite, opacidade de córnea, cegueira e descarga ocular (LEMOS et al. 1996, 2002, MUSTAFA et al. 2012).

A dermatite fotossensível, ou fotossensibilização, é amplamente diagnosticada em bovinos (MOREIRA et al. 2009), caprinos (LEMOS et al. 1998, SILVA et al. 2006

MACÊDO et al. 2008), equinos (BARBOSA et al. 2006), bubalinos (ROZZA et al. 2004) e ovinos (LEMOS et al. 1996, CRUZ et al. 2000, DRIEMEIER et al. 2002, SILVA et al. 2006, BRUM et al. 2007, MACÊDO et al. 2008, MENDONÇA et al., 2008, SATURNINO et al., 2010, CASTRO et al. 2011, MUSTAFA et al. 2012, GRACINDO et al. 2014) associados à ingestão de *Brachiaria* spp. e tendem a ocorrer quando o dano hepático é generalizado (MOTTA et al. 2000).

A fotossensibilização (LEMOS et al. 1996, STEGELMEIR 2002, GRAYDON et al. 1991), se refere à sensibilidade extrema da pele em contato com a luz solar, mediada pela presença de filoteritina como agente fotodinâmico. O pigmento filoteritina, quando há obstrução biliar, não é eliminado e se acumula nos tecidos (SANTOS et al. 2008), especialmente em áreas despigmentadas ou desprotegidas de pelo e lã (TOKARNIA et al. 2000, BRUM et al. 2007, SATURNINO et al. 2010) reage com a luz ultravioleta, formando radicais livres de oxigênio no citosol da célula, que causa ruptura de lisossomos, desgranulação de mastócitos cutâneos, e gera intensa inflamação que caracteriza a fotodermatite, ou fotossensibilização secundária ou hepatógena (SALA et al. 2007, SANTOS et al. 2008). A histamina liberada pela desgranulação de mastócitos aumenta a permeabilidade vascular levando ao edema (YAGER & SCOTT 1993).

A fotossensibilização hepatógena em bovinos foi associada a plantas hepatotóxicas como *B. decumbens*, *Panicum* spp., *Tribulus terrestris*, *Cynodon dactylon* (grama bermuda), *Trifolium pratense* (trevo vermelho) (MOTTA et al. 2000), *Lantana* spp. (RISSI et al. 2007) e *Myoporum* spp. (SANTOS et al. 2008).

À necropsia, pode-se observar principalmente vesícula biliar distendida, fígado de coloração amarelado, aumentado de volume, firme, e com pontos esbranquiçados no parênquima nos casos crônicos, rins de coloração castanho-escuros (LEMOS et al. 1998, CASTRO et al. 2011, SANTOS Jr 2008, SANTOS et al. 2008).

As lesões histológicas consistem em degeneração epitelial, necrose e hiperplasia dos ductos biliares, tumefação difusa de hepatócitos e fibrose periportal. Observam-se também macrófagos espumosos nos linfonodos hepáticos, mesentéricos e no fígado. Imagens negativas de cristais no lúmen de ductos biliares associado a infiltrado inflamatório mononuclear periductal, tumefação e vacuolização de hepatócitos podem estar associados. Células gigantes multinucleadas podem ser

observadas no parênquima hepático (DRIEMEIER et al. 1998, LEMOS et al. 1998, BRUM et al. 2007, BRUM et al. 2007 CASTRO et al. 2011).

Hepatócitos podem apresentar, na microscopia eletrônica, presença de cristais aciculares no interior de macrófagos e hepatócitos, proliferação do retículo endoplasmático liso (REL) e material granular eletrodense no interior de lisossomos de hepatócitos. Os achados ultraestruturais sugerem que o efeito tóxico se inicia nos hepatócitos com posterior colangiopatia e fotossensibilização (DRIEMEIER et al. 1998, 2002, SANTOS Jr 2008).

2.5. Patologia clínica

A análise de atividade séria de GGT (gama-glutamiltransferase) vem sendo amplamente utilizada como marcador fenotípico de lesão hepática em ovinos, relacionada com a severidade da lesão causada pela intoxicação por esporodesmina (TOWERS & STRATTON 1978, MORRIS et al. 1991, 1994, 2002). Os níveis séricos de GGT também são considerados importantes na identificação de animais intoxicados por *Brachiaria* spp. (GRACINDO et al. 2014, FACCIN et al. 2014). A dosagem de AST (aspartato aminotransferase), em conjunto com GGT, é utilizada como exame complementar no diagnóstico de lesão hepática em ruminantes (HANSEN et al. 1994, FIORAVANTI 1999).

A enzima GGT está presente em todas as células, com exceção das células musculares. Sua atividade é especialmente alta nos rins e fígado, mas apenas as enzimas de origem hepática são encontradas no plasma, uma vez que as enzimas de origem renal são excretadas na urina (SANTOS et al. 2008). Sua presença é evidente na membrana plasmática de células dos ductos biliares, portanto seus níveis elevados na circulação são observados após lesões hepáticas, colestase (MEYER et al. 1995, TENNANT 1997) intra e extra-hepática e com proliferação de ductos biliares (SANTOS et al. 2008).

A enzima AST presente no citoplasma e na mitocôndria dos hepatócitos, células musculares estriadas esquelética e cardíaca e eritrócitos. (MEYER et al. 1995, WISLOFF et al. 2002). A AST, avaliada em conjunto com CK (creatina fosfoquinase) e lactato desidrogenase (LDH), é utilizada para avaliar lesão muscular (SANTOS et al. 2008).

2.6. Detoxicação hepática

O fígado é o órgão mais importante para detoxificação de estrógenos de plantas por conjugação (MEAGHER et al. 2001), desempenha papel primordial na maioria dos processos metabólicos, de síntese, excreção e catabolismo. É o principal órgão de biotransformação dos xenobióticos, por meio do sistema microsomal, sistema citocromo P450, constituído por enzimas localizadas na superfície do REL de hepatócitos (PEREIRA 2004), mediado por monoxigenases associadas ao NADPH e oxigênio molecular, realizando a oxidação e metabolização de diversas substâncias (OLIVEIRA et al. 2006).

A intoxicação de um elemento está relacionada a cinética de absorção, metabolismo e eliminação. A taxa de absorção pode ser influenciada pela quantidade ingerida, tempo de retenção e fator de extração do elemento, absorção pelo rúmen e eliminação pelos rins ou fígado (RALPHS et al. 1988). Uma vez que a substância tóxica seja absorvida pelo trato gastrointestinal, o organismo pode excretar a substância sem modificá-la, sequestrar em local de armazenamento não ativo, detoxificar através de rearranjo molecular ou sofrer os efeitos de intoxicação. Todos os vertebrados possuem mecanismos gerais de detoxicação contra diversos agentes tóxicos, como alcaloides, glicosídeos, saponinas ou taninas. Detoxicação é quimicamente realizado em conjunto com oxidação, redução, hidrólise, esterificação, N-desalquilação e conjugação (FOWLER 1983). A maior parte da detoxificação ocorre através da atividade enzimática microsomal dos hepatócitos (FREELAND & JANZEN 1974).

Dentre os principais mecanismos envolvidos na resistência dos animais à intoxicação por plantas, é importante considerar as vias de detoxicação hepática (FLAOYEN & JENSEN 1991). O sistema citocromo P450 (CYP), constituído por enzimas localizadas na superfície do REL dos hepatócitos, é considerado um dos mais importantes sistemas de detoxificação, onde ocorre a oxidação e metabolização de diversas substâncias (OLIVEIRA et al. 2006, TANIGUCHI & GUENGERICH 2012). As reações mediadas pelo CYP respondem pela maior parte das metabolizações oxidativas de moléculas lipofílicas e esteroidais (BISCHOFF & RAMAIAH 2007, TANIGUCHI & GUENGERICH 2012).

São conhecidas 18 famílias e 43 subfamílias de isoenzimas CYPs, sendo CYP1, CYP2 e CYP3 e os alelos CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4, apontados como os principais responsáveis pela metabolização de drogas e fármacos no REL dos hepatócitos (PINTO & DOLAN 2011).

A hiperplasia de REL é descrita em bovinos (DRIEMEIER et al. 1998) e ovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. e em animais intoxicados (DRIEMEIER et al. 2002, SANTOS Jr 2008). O mecanismo pelo qual ocorre a hiperplasia do REL na intoxicação pela *Brachiaria* spp. permanece ainda desconhecido. Contudo, saponinas esteroidais são glicosídeos presentes na *Brachiaria* spp., compostos de parte lipofílica, sapogeninas, e porção hidrofílica formada por cadeias de açúcares (SANTOS et al. 2000). A resposta de hiperplasia do REL nos hepatócitos possivelmente reflete a metabolização hepática das saponinas de natureza esteroideal presentes nas pastagens de braquiária.

A administração de drogas como fenobarbital, um potente indutor da citocromo P-450, é capaz de produzir marcante hiperplasia do REL e de influenciar inespecificamente a metabolização de diversas substâncias por induzir enzimas de fase 1 e fase 2, especialmente CYP3A1 (EJIRI et al. 2005). A administração de fenobarbital para ovinos retardou a intoxicação por *Brachiaria decumbens* e reduziu a severidade dos sinais clínicos em comparação àqueles que não receberam a droga (HASIAH et al. 2000). Estas observações demonstram a importância do REL e seu sistema enzimático na detoxificação dos compostos tóxicos presentes na gramínea.

Ovinos intoxicados por *B. decumbens* apresentam uma redução da citocromo P450 e de outras enzimas microssomais no fígado e rins, diminuindo a capacidade de metabolização e detoxificação de substâncias (KHAIRI et al. 2000). Esses achados sugerem que o efeito das saponinas presentes na gramínea, interfere no sistema de enzimas microssomais de ovinos susceptíveis à intoxicação, uma vez que a resistência às plantas que contém saponinas parece estar ligada a maior atividade daquele sistema enzimático (FLAOYEN & JENSEN 1991).

O sistema citocromo P450, representado pela expressão e atividade das CYPs no metabolismo de detoxificação, pode apresentar grande variabilidade individual (GÓMEZ-LECHÓN et al. 2007), explicada pela característica genética polimórfica das enzimas (MILLER et al. 1997, SMITH et al. 1998, HELLER 2013). Mutações do gene P450 resultam em variantes alélicas que são responsáveis pela metabolização de

drogas e fármacos, determinando a susceptibilidade hospedeiro-específica à essa substância (INGELMAN-SUNDBERG 2005, GÓMEZ-LECHÓN et al. 2007).

Diferenças de atividades de detoxificação entre indivíduos devem ser atribuídas, além do polimorfismo genético, aos fatores não genéticos como idade, gênero, características hormonais, doenças hepáticas e administração de fármacos e à modulação da expressão das CYPs por fatores ambientais (DAI et al. 2001, PÉRES et al. 2003, GÓMEZ-LECHÓN et al. 2007).

O sistema enzimático microsomal apresenta variação com idade, tamanho, sexo e condição reprodutiva. Animais adultos possuem o sistema enzimático microsomal mais desenvolvido e maior facilidade de conjugação do que animais jovens (FREELAND & JANZEN 1974). Investigações acerca da ontogenia revelam ausência do citocromo P450 em fetos de ovinos e aumento gradual do nascimento até 11 meses de idade (GALTIER & ALVINERIE 1996). Essas observações reforçam o fato que ovinos jovens são considerados mais susceptíveis à intoxicação por *Brachiaria* spp. que animais adultos (LEMOS et al. 1998, CASTRO et al. 2011, SANTOS et al. 2008). O processo de maturação do sistema enzimático microsomal possivelmente explique a maior suscetibilidade de ovinos jovens à intoxicação pela gramínea.

Apesar das diferenças existentes entre as CYPs, sua relevância e atividade em várias espécies (GÓMEZ-LECHÓN et al. 2007, BAILLIE & RETTIE 2011) foi também demonstrada a importância das isoenzimas CYP2B e CYP3A em ovinos na metabolização de drogas (GALTIER & ALVINERIE 1996) e na bioativação e detoxicação de alcaloides pirrolizidínicos (HUAN et al. 1998).

2.7. Adaptação e manejo

A profilaxia e controle das intoxicações por plantas deve ser realizado com base no conhecimento dos fatores ligados as plantas, aos animais, ao ambiente e ao manejo empregado. As medidas preventivas incluem o isolamento de áreas contaminadas por plantas tóxicas (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001), eliminação mecanicamente ou quimicamente de espécimes tóxicos, utilização de sementes controladas de espécies não tóxicas, confecção de feno e silagem com espécies não tóxicas, técnicas de aversão (no caso da intoxicação por *Baccharis coridifolia*), bem

como manejo correto dos animais e das pastagens (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001, RISSI et al. 2007).

O manejo de pastagens é a forma mais econômica de prevenir as perdas ocasionadas por intoxicação por plantas, prevê evitar o pastoreio excessivo e, utilizar animais de espécies ou idades resistentes a determinada planta (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001).

Animais de vida livre promovem adaptação às plantas tóxicas naturalmente utilizando as estratégias: evitar (*avoidance*), diluição, degradação e detoxificação. A adaptação comportamental, ferramenta essencial para sobrevivência das espécies, é um processo de aprendizagem em que alguns animais rejeitam determinadas plantas tóxicas. A diluição do agente tóxico ocorre pela tendência dos herbívoros silvestres em consumir grande variedade de plantas (FOWLER 1983).

Relatos indicam que animais silvestres consomem de forma segura plantas que são letais para rebanhos. Para diminuir os efeitos tóxicos das plantas ocorrem modificações gastrointestinais e adaptações fisiológicas digestivas. Herbívoros, em particular, exigem assistência dos microrganismos para disponibilização de nutrientes associados a lignina e celulose (FOWLER 1983). Alguns animais são capazes de degradar compostos secundários da planta, potencialmente letais, por meio dos microrganismos, através da modificação da população bacteriana (FREELAND & JANZEN 1974). A detoxicação microbiana do rúmen, pela adaptação gradual da microflora ruminal aos princípios tóxicos presentes na planta, podem atuar como forma de controle de intoxicação por plantas (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001).

Bovinos submetidos ao pastejo em *B. decumbens* apresentaram uma redução maior dos níveis de enzimas da biotransformação hepática quando comparados aos ovinos. Estas observações sugerem que há outros fatores desconhecidos envolvidos além da biotransformação, na maior resistência dos bovinos a intoxicação pela planta (KHAIRI et al. 2000).

A natureza esteroideal das saponinas presentes nas pastagens de braquiária, possivelmente explique a hiperplasia do REL em hepatócitos. Substâncias lipídicas e esteroideais são em sua maioria metabolizadas no REL pelo sistema citocromo P-450 (STROMBECK & GUILFORD 1991, FLORIO & SOUSA 2008).

Foram relatadas alterações nos hepatócitos induzidas pela administração de fenobarbitona (HASIAH et al. 2000). A fenobarbitona é um potente indutor da

citocromo P-450, aumentando em até 90 vezes sua atividade quando administrada por longos períodos e promovendo também marcante hiperplasia do REL. É notório, que a indução da citocromo P-450, como acontece com a administração de fenobarbitona, é capaz de influenciar inespecificamente a metabolização de diversas substâncias (STROMBECK & GUILFORD 1991, HASIAH et al. 2000). Ovinos que receberam fenobarbitona via oral, demoraram mais para se intoxicarem e apresentaram sinais clínicos muito menos severos que aqueles que não receberam a droga (KHAIRI et al. 2000). Estas observações sugerem a importância do REL e seu sistema enzimático na detoxificação das saponinas esteroidais presentes nas pastagens de braquiária.

A administração de griseofulvina em ovinos induziu o aumento na concentração de enzimas hepáticas responsáveis pela biotransformação, mas também não foi capaz de proteger os animais da intoxicação pela braquiária (HASIAH et al. 2003).

O sistema enzimático precisa ser estimulado por exposição prévia ao agente tóxico, induzido pelo consumo de dose não letal da planta tóxica (FOWLER 1983). Herbívoros de vida livre tem maior exposição a doses não letais de diversos componentes secundários das plantas e, portanto, mais facilidade de lidar com agentes tóxicos do que animais de rebanhos ou de cativeiro (FREELAND & JANZEN 1974). A resistência adquirida está associada a uma adaptação do sistema P450 do fígado (ANJOS et al. 2010).

Alguns experimentos com plantas tóxicas demonstraram que a administração continuada de doses não tóxicas podem induzir resistência à intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* (PESSOA et al. 2013) e *Senecio brasiliensis* em ovinos. Entretanto, se o estímulo for removido, os hepatócitos retornam ao seu estado fisiológico e há degradação lisossomal das enzimas adaptadas (GRECCO et al. 2012).

A resistência à monocrotalina em ovinos foi obtida através da administração experimental de doses diárias não tóxicas de sementes de *Crotalaria retusa*, que em doses únicas de 3-4g/kg causam intoxicação aguda em ovinos, porém, doses diárias de 2g/kg induzem resistência à dose de até 10g/kg (ANJOS et al. 2010).

Alcalóides pirrolizidínicos tornam-se hepatotóxicos quando convertidos a pirroles pelas enzimas microssomais do fígado (FOWLER 1983). A administração de doses diárias não tóxicas de folhas frescas *Amorimia septentrionalis* (DUARTE et al. 2013) e *Palicourea aneofusca* (OLIVEIRA et al. 2013) em períodos alternados que

permitam a detoxicação do monofluoroacetato de sódio (MFA), induz resistência contra intoxicações pela planta. Foi sugerido que alimentação contendo substrato estimula a multiplicação das bactérias que degradam MFA, existentes no rúmen (CAMBOIM et al. 2012).

A resistência a intoxicação por *A. rigida* pode ser induzida pela administração diária de doses não letais da planta, bem como por transfaunação de conteúdo ruminal de animais resistentes para animais susceptíveis (CAMBOIM et al. 2012).

Algumas investigações demonstram que plantas podem produzir efeito acumulativo, como *L. camara* (TOKARNIA et al. 1999), quando oferecidas em pequenas doses diariamente. *Lantana* spp., assim como *Brachiaria* spp., produzem fotossensibilização hepatógena em ruminantes (RIET-CORREA & MENDEZ 2007).

A intoxicação por *B. decumbens* modifica a população microbiota ruminal e diminui os níveis de ácidos graxos voláteis de ovinos (SALAM ABDULLAH & RAJION 1990). A modificação da população da microbiota no rúmen pode levar a tolerância adquirida a diversos compostos tóxicos de plantas (DAWSON & ALLISON 1988).

Foi sugerido evitar o acesso de animais jovens aos piquetes de *Brachiaria* spp. por demonstrarem maior susceptibilidade do que os adultos (LEMOS et al. 1997, CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011). Contudo, animais jovens de rebanhos adaptados podem ser mantidos em piquetes com a planta sem apresentarem problemas de toxicidade (GRACINDO et al. 2014).

Outras formas de controle de intoxicação por plantas incluem vacinação de animais, controle biológico por fungos ou insetos. Aplicação de substâncias neutralizantes, aversão alimentar condicionada e seleção de forrageiras menos tóxicos (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001).

2.8. Transfaunação

A transfaunação pode ser utilizada para detoxificar metabólitos tóxicos de plantas através dos microrganismos presentes no conteúdo ruminal (DePETERS & GEORGE 2014). Bactérias rumenais capazes de degradar o monofluoroacetato de sódio podem ser transfaunadas para conferir resistência para animais susceptíveis, à intoxicação por *A. septentrionalis*, *A. rigida* e *P. aneofusca* (CAMBOIM et al. 2012, DUARTE et al. 2013, OLIVEIRA et al. 2013).

Diversos relatos demonstram os benefícios da utilização de conteúdo ruminal, pois microrganismos possuem capacidade de detoxificar metabólitos tóxicos de plantas, como mimosina, monofluoracetato de sódio (MFA) e tanino. A *mimosina* (α -amino- β -(N-[3-hydroxy-4-pyridone]) ácido propriônico), um aminoácido tóxico presente em plantas do gênero *Leucaena* e *Mimosa*, inibe a síntese de proteínas por atividade antimetabólica que provoca emagrecimento e queda acentuada de pelo, quando consumida por longo período. Alguns microrganismos do rúmen são capazes de degradar mimosina e seu metabólito tóxico (3-hydroxy-4-pyridone). A transferência desses microrganismos para outros animais pode ser feita através de transfaunação do conteúdo ruminal (JONES & MEGARRITY 1986).

Foi sugerido como forma de controlar as intoxicações por plantas que contêm monofluoracetato de sódio (MFA), a transfaunação de bactérias capazes de degradar MFA, metabólito tóxico de *A. septentrionalis*, para caprinos susceptíveis. Foi demonstrado que a administração diária e contínua de doses não tóxicas de *A. septentrionalis* em períodos alternados, permite a detoxificação do MFA por induz a multiplicação dessas bactérias capazes de degradar o monofluoracetato de sódio e, portanto, induzir resistência contra a intoxicação por esta planta. Essa resistência pode ser transmitida de um animal resistente para um animal susceptível mediante a transfaunação de conteúdo ruminal (DUARTE et al. 2013).

Tanino é um composto polifenólico de plantas, utilizado para reduzir a produção de metano em ovinos e caprinos e otimizar utilização de nitrogênio por ruminantes. Alguns microrganismos fecais de animais adaptados possuem habilidade de degradar tanino e, quando isolados, podem ser transferidos por transfaunação (ODENYO et al. 2001, EPHRAIM et al. 2005).

A administração de conteúdo ruminal de ovinos adultos adaptados ao pastejo em *B. brizantha* para cordeiros susceptíveis foi capaz de reduzir a taxa de morbidade da intoxicação pela gramínea no rebanho, possivelmente por auxiliar na degradação dos compostos tóxicos (ALBERNAZ et al. 2010).

É conhecida a metabolização rumenal das saponinas contidas na *Brachiaria* spp. para a formação de compostos tóxicos, porém, a transfaunação de líquido rumenal de animais adaptados para ovinos susceptíveis à intoxicação pode ser considerada uma forma de transferência de resistência. Os resultados sugerem que possam existir microorganismos rumenais em ovinos adaptados, capazes de auxiliar

na degradação ou inativação das saponinas da gramínea, diminuindo sua toxicidade. A detoxicação microbiana do rúmen, pela adaptação gradual da microflora ruminal aos princípios tóxicos presentes nas plantas, pode ser utilizada como forma de controle e prevenção das intoxicações (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001).

2.9. Herdabilidade

A transmissão de resistência por herdabilidade às toxinas é apontada como um mecanismo importante para explicar a enorme variação que existe nos níveis de suscetibilidade dos animais frente às intoxicações (TOWERS 2006, BISHOP & MORRIS 2007). A seleção de rebanhos resistentes e minimizar a utilização de pastos com presença de esporidesmina são consideradas as principais medidas no controle do eczema facial em ovinos (MORRIS et al. 1991, MORRIS 2009).

A seleção de linhagens de ovinos resistentes ao eczema facial foi desenvolvida na Nova Zelândia (MORRIS et al. 1998) e já são encontrados rebanhos comerciais selecionados com essa característica naquele país (BISHOP & MORRIS 2007). A herdabilidade das características de resistência à intoxicação por esporidesmina possuem taxa de transferência 1,77 vezes mais rápido do que o rebanho susceptível tende a se tornar mais susceptível (MORRIS et al. 1994).

A resistência à intoxicação pelo endófito do capim festuca, *Festuca arudinacea*, também pode ser transmitida geneticamente para bovinos e ratos pela seleção dos animais resistentes (GOULD & HOHENBOKEN et al. 1993, MILLER et al. 1994, HOHENBOKEN & BLODGETT 1997, HOHENBOKEN et al. 2000).

2.10. Controle e profilaxia

Entre as formas de controle de intoxicação por plantas, torna-se relevante evitar o pastejo de animais jovens e a utilização de pastagens durante a fase de brotação, estágio de maior toxicidade da gramínea (LEMOS et al. 1997, CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011). Contudo, é viável a utilização de detoxicação microbiana do rúmen, pela adaptação gradual da microflora ruminal aos princípios tóxicos presentes na planta (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001), pela administração continuada de doses não tóxicas da planta ou pela transfaunação dos microrganismos presentes no conteúdo ruminal (DePETERS & GEORGE 2014) de animais adultos adaptados.

A seleção de rebanhos ovinos resistentes à intoxicação deve ser melhor investigada, principalmente calçada no acompanhamento dos níveis de GGT dos cordeiros introduzidos em pastagens tóxicas, para utilização somente de animais reprodutores não susceptíveis à toxina.

3. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo investigar as formas de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos:

- Avaliar a indução da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. através do manejo adaptativo de ovinos utilizando a exposição controlada dos animais aos piquetes da gramínea ou utilizando o pastejo em variedades menos tóxicas;
- Avaliar a transferência da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. por transfaunação ruminal;
- Avaliar a transferência hereditária da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp.

4. REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, T.T.; SILVEIRA, J.A.S.; SILVA, N.S.; OLIVEIRA, C.H.S.; BELO REIS, A.S.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira 30(9):741-748. 2010.
- ANDRADE, S.A.; NOTHENBERG, M.S.; RETZ, L.; BUENO, P.C. Estudo sobre cobaias alimentadas com *Brachiaria* sp. ("tanner grass"). Biology. v.42, p. 243-246, 1975.
- ANJOS, B.L.; NOBRE, V.M.T.; DANTAS, A.F.M.; MEDEIROS, R.M.T.; OLIVEIRA, NETO T.; MOLYNEUX, R.J. & RIET-CORREA, F. Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: Acquired resistance by continuous administration of low doses. Toxicon 55:28-32. 2010.
- BAILLIE, T.A.; RETTIE, A.E. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: Influence of intra- and inter-species in drug metabolism. Drug Metab. Pharmacokinet. 26(1): 15-29. 2011.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira. 26(3):147-153, jul./set. 2006.
- BAUER, M.O.; GOMIDE, J.A.; SILVA, E.A.M.; REGAZZI, A.J.; CHICHORRO, J.F. Características anatômicas e valor nitritivo de quatro gramíneas predominantes em pastagem natural de Viçosa, MG. Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, n.1, p. 9-17. 2008.
- BISCHOFF, K.; RAMAIAH, S. Liver toxicity. In: GUPTA, R.C. Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles. Ed. Elsevier. 1ed. New York. USA. 145-160. 2007.
- BISHOP, S.C.; MORRIS, C.A. Genetics of disease resistance in sheep and goats. Small Ruminant Research 70. 48–59. 2007.
- BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS R.A.A.; RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M.C.S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.27, p.39-42, 2007.
- CAMBOIM, E.K.A.; ALMEIDA, A.P.; TADRA-SFEIR, M.Z.; JUNIOR, F.G.; ANDRADE, P.P.; MCSWEENEY, C.S.; RIET-CORREA, F. & MELO, M.A. Isolation of sodium

- fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. *Scientific World Journal*. Article ID 178254, 6 pages. 2012.
- CASTRO, M.B.; SANTOS JR., H.L.; MUSTAFA, V.S.; GRACINDO, C.V.; MOSCARDINI, A.C.R.; LOUVANDINI, H.; PALUDO, G.R.; BORGES, J.R.J.; HARAGUCHI, M.; FERREIRA, M.B.; RIET-CORREA, F.; *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings. In: RIET-CORREA F., PISTER J., SCHILD A.L. & WIERENGA T. (Eds). *Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins*. CAB International, London. p.111-117. 2011.
- CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V.S.; COLODEL, E.M.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Veterinary & Human Toxicology*, v.42, p.142-145, 2000.
- DAI, D.; TANG, J.; ROSE, R.; HODGSON, E.; BIENSTOCK, R.J.; MOHRENWEISER, H.W.; GOLDSTEIN, J.A. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolise testosterone and chlorpyrifos, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299. 825–831. 2001.
- DAWSON K.A.; ALLISON M.J. Digestive Disorders and nutritional toxicity, p.445-459. In: Hobson P.N. (Ed.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science, New York. 826p. 1988.
- DePETERS, E.J.; GEORGE, L.W. Rumen transfaunation. *Immunol Lett.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.009>
- DiMENNA, M.; CAMPBELL, J.; MORTIMER, P.H. Sporidesmin production and sporulation in *Pithomyces chartarum*. *Journal of General Microbiology*, Reading, v. 61, p. 87-96, 1970.
- DIAS, M.J.; DIAS, D.S.O.; BRITO, R.A.M. Potencialidades da produção de ovinos de corte em Goiás. In: V simpósio da sociedade brasileira de melhoramento animal, Pirassununga: Anais...São Paulo. 2004.
- DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; SEITZ A.L.; BARROS, S.S.; CRUZ, C.E.F. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon*, v.40, p.1027-1031, 2002.
- DRIEMEIER, D.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de

- macrófagos espumosos (“foam cells”). Pesquisa Veterinária Brasileira, v.18, p. 29 - 34, 1998.
- DRIEMEIER, D., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V., BRITO, M.F. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp. no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.19, p.79-83, 1999.
- DUARTE, A.L.L.; MEDEIROS, R.M.T.; CARVALHO, F.K.L.; LEE, S.T.; COOK, D.; PFISTER, J.A.; COSTA, V.M.M.; RIET-CORREA, F. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. J. Appl. Toxicol., 34: 220–223. doi: 10.1002/jat.2860. 2013.
- EJIRI, N.; KATAYAMA, K.; DOI, K. Induction of cytochrome P450 isozymes by phenobarbital in pregnant rat and fetal livers and placenta. Experimental and molecular pathology 78: 150-155. 2005.
- EPHRAIM, E.; ODENYO, A.; ASHENAFI, M. Isolation and characterization of tannin-degrading bacteria from faecal samples of some wild ruminants in Ethiopia. Anim Feed Sci Technol; 118:243–53. 2005.
- FACCIN, T.C.; RIET-CORREA, F.; RODRIGUES, F.S.; SANTOS, A.C.; MELO, G.K.A.; SILVA, J.A.; FERREIRA, R.; ÍTAVO, C.C.B.F.; LEMOS, R.A.A. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. Toxicon 82. 1–8. 2014.
- FIORAVANTE, M.C.S. Incidência, avaliações clínicas, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporodesmina em bovinos. 1999. 256f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista, Botucatu.
- FLAOYEN, A.; WILKINS, H.K.; WILKINS, A.L. Tolerance to the nephrotoxic component of *Nartheceum ossifragum* in sheep: The effects of repeated oral doses of plant extracts. Veterinary Research Communications, v, 25, n. 2, p. 127-136, 2001.
- FLAOYEN, A.; JENSEN, E.G. Microsomal enzymes in lambs and adult sheep, and their possible relationship to alveld. Vet. Res. Commun. 15: 271-278, 1991.
- FLÓRIO, J.C.; SOUSA, A.B. Toxicocinética e toxicodinâmica. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada a Medicina Veterinária. 1ed. São Paulo: Manole. p.15-39. 2008.
- FOWLER, M.E. Plant poisoning in free-living wild animals: A Review. Journal of Wildlife Diseases, 19(1), 34-43. 1983.

- FREELAND, W.J.; JANZEN, D.H.. Strategies in herbivory by mammals: The role of plant secondary compounds. *Am. Nat.* 108: 269-289. 1974.
- FURLAN, F.H.; COLODEL, E.M.; LEMOS, R.A.A.; CASTRO, M.B.; MENDONÇA, F.S.; RIET-CORREA, F. Poisonous Plants Affecting Cattle in Central-Western Brazil. *IJPPR*, vol. 2. 2012.
- GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Pharmacological basis for hepatic drug metabolism in sheep. *Vet Res.* 27(4-5): 363-72. 1996.
- GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; CASTELL, J.V.; DONATO, M.T. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-Biological Interactions* 168: 30–50. 2007.
- GOULD, L.S.; HOHENBOKEN, W.D. Differences between progeny of beef sires in susceptibility to Fescue Toxicosis. *J. Anim. Sci.* 71:3025-3032. 1993.
- GRACINDO, C.V.; LOUVANDINI, H.; RIET-CORREA F.; BARBOSA-FERREIRA, M.; CASTRO, M.B. Performance of sheep grazing in pastures of *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. *Trop Anim Health Prod.* 46:733–737. 2014.
- GRAYDON, R.I.; HAMID, H.; ZAHARI, P. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. *The Australian Veterinary Journal.*, v. 68, p.234-236, 1991.
- GRECCO, F.B.; ESTIMA-SILVA, P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M.P.; RAFFI, M.B. & SCHILD, A.L. Intoxicação experimental aguda por *Senecio brasiliensis* em ovinos e indução de resistência à intoxicação. *Pesq. Vet. Bras.* 32(9):912-916. 2012.
- HANSEN, D.E.; McCOY, R.D.; HEDSTROM, O.R.; SNYDER, S.P.; BALLERSTEDT, P.B. Photosensitisation associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. *Journal American Veterinary Society, Hasting*, v. 204, n.10, p. 1668-1671, 1994.
- HASIAH, A.H.; ELSHEIKH, H.A.; SALAM ABDULLAH, A.; KHAIRI, H.M.; RAJION, M.A. Effect of phenobarbitone treatment against signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in sheep. *The Veterinary Journal.* 160:267-272. 2000.
- HELLER, F. Genetics/Genomics and drug effects. *Acta Clinica Belgica.* 68-2. 2013.
- HOHENBOKEN, W.D.; ROBERTSON, J.L.; BLODGETT, D.J.; MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R. Sporidesmin-induced mortality and histological lesions in mouse

- lines divergently selected for response to toxins in endophyte-infected fescue. *J. Anim. Sci.* 78:2157. 2000.
- HOHENBOKEN, W.D.; BLODGETT, D.J. Growth and physiological responses to toxicosis in lines of mice selected for resistance or susceptibility to endophyte-infected tall fescue in the diet. *J. Anim. Sci.*, 75, 2165–2173. 1997.
- HUAN, J.; MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R.; CHEEK, P.R. The Roles of CYP3A and CYP2B Isoforms in Hepatic Bioactivation and Detoxification of the Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine in Sheep and Hamsters. *Toxicology and applied Pharmacology* 151, 229-235. 1998.
- INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future, *Trends Pharmacol. Sci.* 25.193–200. 2004.
- JONES, R.J.; MEGARRITY, R.G. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of leucaena. *Aust Vet J*; 63:259–62. 1986.
- KHAIRI, H. M.; ELSHEIKH, H. A.; SALAM ABDULLAH, A. The effect of signal grass (*Brachiaria decumbens*) on drug-metabolizing enzymes in sheep and comparison with normal cells. *Veterinary & Human Toxicology*. v.42, p.193-195, 2000.
- LAJIS, N.H.; ABDULLAH, A.S.; SALIM, S.J.; BREMNER, J.B.; KHAN, M.N. Epi-sarsasapogenin and epi-smilagenins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. *Steroids*. v.58, p.387-9, 1993.
- LEMOS R.A.A.; PURISCO E. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena. In: LEMOS, R.A.A.; BARROS, N.; BRUM, K.B. *Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: Perguntas e respostas*. Campo Grande:UFSM. 2002. 292p.
- LEMOS, R.A.A.; FERREIRA, L.C.L.; SILVA, S.M.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v.26, p.109-113, 1996.
- LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; HERRERO JR, G.O.; SILVEIRA, A.C.; PORFÍRIO, L.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*, v.28 n.3 507-510. 1998.

- LEMOS, R.A.A.; SALVADOR, S.C.; NAKAZATO, L. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 39:376-377. 1997.
- LIMA, F.G.; HARAGUCHI, M., PFISTER, J.A., GUIMARAES, V.Y., ANDRADE, D.D.F., RIBEIRO, C.S., COSTA, G.L., ARAUJO, A.L.L., FIORAVANTI, M.C.S. Weather and plant age affect the levels of steroidal saponin and *Pithomyces chartarum* spores in *Brachiaria* grass. *International Journal of Poisonous Plant Research*, 2, 45–53. 2012.
- MACÊDO, V.P.; SILVEIRA, A.C.; GARCIA, C.A.; MONTEIRO, A.L.G.; MACEDO, F.A.F.; SPERS, R.C. Desempenho e características de carcaça de cordeiros alimentados em comedouros privativos recebendo rações contendo semente de girassol. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.11, p.2041-2048, 2008.
- MEAGHER, L.P.; MILES, C.O.; FAGLIARI, J.J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. *Veterinary and Human Toxicology*, Manhattan, 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. *An. Feed Sci. and Tecno.*, v.91, p. 157-170, 2001.
- MENDONÇA, F.S.; CAMARGO, L.M.; FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; EVÊNCIO-NETO, J. Aspectos clínicos e atológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Gramineae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.9, n.4, p.1034-1041, 2008.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. *Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico*. Ed. Roca. São Paulo.1995.
- MILES, C.O.; MUNDAY, S.C.; HOLLAND, P.T.; SMITH, B.L.; EMBLING, P.P. Identification of a saponin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *N. Z. Vet. J.* 39:150. 1991.
- MILLER, B.F.; ARMSTRONG, K.L.; WILSON, L.A.; HOHENBOKEN, W.D.; SAACKE, R.G. Variation Among Inbred and Line cross Mice in Response to Fescue Toxicosis. *J. Anim. Sci.* 72: 2896 – 2904. 1994.

- MILLER, M.S.; MCCARVER, D.G.; BELL, D.A.; EATON, D.L.; GOLDSTEIN, J.A. Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes, *Fundam. Appl. Toxicol.* 40. 1–14. 1997.
- MOREIRA, C.M.; BANYS, V.L.; PINTO, A.S.; FRANCO, L.A.S.; HARAGUSHI, M.; FIORAVANTI, M.C.S. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*: desempenho, avaliação da quantidade de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* e teor de saponina das pastagens. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 1, p. 184-194, jan./mar. 2009.
- MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R.; WHEELER, M.; WESSELINK, C. Selection for or against facial eczema susceptibility in Romney sheep, as monitored by serum concentrations of a liver enzyme, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38:2, 211-219. 1994.
- MORRIS, C.A. Review of genetic parameters for disease resistance in sheep in New Zealand and Australia. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.* 18:263-271. 2009.
- MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R.; WHEELER, M.; AMYES, N.C. A note on the genetics of resistance or susceptibility to ryegrass staggers in sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38:3, 367-371. 1995.
- MORRIS, C.A.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; WEST, C.J.; WHEELER, M. Faecal nematode egg counts in lactating ewes from Romney flocks selectively bred for divergence in lamb faecal egg count. *Anim. Sci.* 67, 283–288. 1998.
- MORRIS, C.A.; SMITH, B.L.; HICKEY, S.M. Relationship between sporidesmin-induced liver injury and serum activity of gamma-glutamyltransferase in Romney lambs sired by facial eczema-resistant or control rams. *New Zealand Veterinary Journal*, Volume 50, Issue 1, pp 14-18. 2002.
- MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R.; WESSELINK, C.; SOUTHEY, B.R. Effects of facial eczema on ewe reproduction and postnatal lamb survival in Romney sheep, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 34:4, 407-412. 1991.
- MOTTA, A.C.; RIVERO, R.G.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; FERREIRA, J.L. Fotossensibilização Hepatógena em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 143-149, 2000.
- MUSTAFA, V.S.; MOSCARDINI, A.R.C.; BORGES, J.R.; RECKZIEGEL, G.C.; RIET-CORREA, F. & CASTRO, M.B. Caracterização da intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. *Pesq. Vet. Bras.* 32(12):1272-1280. 2012.

- ODENYO, A.A.; BISHOP, R.; ASEFA JAMNADASS, G.; ODONGO, D.; OSUJI, P. Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from East African Ruminants. *Anaerobe*; 7:5–15. 2001.
- OLIVEIRA, A.M.; COSTA, L.F.; FONSECA, C.A. Farmacogenética e farmacogenômica da biotransformação de drogas. *Revista eletrônica de farmácia*. v.3, p.39-41, 2006.
- OLIVEIRA, M.D.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, F.K.L.; SILVA, G.B.; PEREIRA, W.S.; MEDEIROS, R.M.T. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(6):731-734. 2013.
- PEREIRA, F.E.L. Etiopatogênese Geral das Lesões. In: BOGLIOLO FILHO, G.B. *Patologia Geral*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 367p. 2004.
- PÉREZ, G.; TABARES, B.; JOVER, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; CASTELL, J.V. Semi-automatic quantitative RT-PCR to measure CYP induction by drugs in human hepatocytes, *Toxicol. in Vitro* 17. 643–649. 2003.
- PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(6):752-758. 2013.
- PINTO, N.; DOLAN, M.E. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*; 12: 487-497. 2011.
- RALPHS, M.H.; OLSEN, J.D.; PFISTER, J.A.; MANNERS, G.D. Plant-animal interactions in Larkspur poisoning in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 2334-2342, 1988.
- RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):183-192. 2011.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq. Vet. Bras.* 21(1):38-42, jan./mar. 2001.
- RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M.D.C. Intoxicações por plantas tóxicas e micotoxinas, p.99-221. In: RIET-CORREA F., SCHILD A.L., LEMOS R.A.A.; BORGES J.R.J. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.2. 3a ed. Pallotti Editora, Santa Maria. 2007.
- RISSI, D. R.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A. L.; TROST, M.E.; BRUM, J.S.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Intoxicações por plantas e micotoxinas

- associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 27(7):261-268, julho 2007.
- ROZZA, D.B.; SEITZ, A.L.; BANDARRA, P.M.; SANTOS, E.O.; DRIEMEIER, D. Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em búfalo. Pesq. Vet. Bras. 24(Supl.):55-56. 2004.
- SALA, R.V.; CREMASCO, A.C.M.; CALDEIRA, C.P.; BANDARRA, M.B.; NERY, R.; SANCHES, C.D.C.; PINCZOWSKI, P.; THOMÉ, H.E.; MOURA, V.M.B.D.; BANDARRA, E.P. Fotossensibilização Hepatógena em bovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha*. UFPEL, 2007.
- SALAM ABDULLAH, A.; LAJIS, N.H.; BREMNER, J.B.; DAVIES, N.W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M.A. Decumbens intoxicated sheep. Veterinary & Human Toxicology, v.34, p.154-155, 1992.
- SALAM ABDULLAH, A.; NORDIN, M.M.; RAJION, M.A. Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in sheep: changes in motility and pH of reticulo-rumen. Veterinary & Human Toxicology, v. 30, p. 256-258, 1988.
- SALAM ABDULLAH, A.; RAJION, M.A. Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in sheep. Changes in rumen microbial populations and volatile fatty acid concentration. Veterinary and Human Toxicology, 32, 444-445. 1990.
- SANTOS Jr, H.L. Estudo da Toxicidade de Diferentes Estágios de Crescimento da *Brachiaria decumbens* em Ovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado. 65p. 2008.
- SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.; BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. Pesq.Vet. Bras., v.28, p.1-14, 2008.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Editora da UFRGS e Editora da UFSC, p 323-354. 2000.
- SATURNINO, K.C.; MARIANI, T.M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM K.B.; FERNANDES, C.E.S.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. Pesq. Vet. Bras. 30(3):195-202. 2010.

- SCHILD, A.L. Doenças tóxicas - Fotossensibilização hepatógena. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., LEMOS, R.A.A., BORGES, J.R.J. Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. 3. ed. Vol. II, Santa Maria: Fernovi editora, 2007. p.39-42.
- SEIFFERT, N.F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. EMBRAPA-CNPQC - Campo Grande. Circular Técnico, n.1, 1980. 83p. Disponível online em:<<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/ct/ct01/index.html>>. Acesso em: 25/10/2009.
- SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M.T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. Pesquisa Veterinária Brasileira, 26(4):223-236, out./dez. 2006.
- SIQUEIRA-SOUZA, V.; SANDRINI, C.N.M.; FIORAVANTI, M.C.S.; HARAGUCHI, M. Avaliação sazonal das saponinas nas pastagens de *Brachiaria* e *Andropogon* do Centro-Oeste Brasileiro. Arquivo do Instituto Biológico, 72(supl 1), p. 49, 2005.
- SMITH, D.A.; ABEL, S.M.; HYLAND, R.; JONES, B.C. Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo, Xenobiotica. 28. 1095–1128. 1998.
- STEGELMEIER, B.L. Equine Photosensitization. Clinical Techniques in Equine Practice. v. 2, 2002. 81-88p.
- STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. Small Animal Gastroenterology. 2ed. London: Wolfe Publishing Ltd. p.744. 1991.
- TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Drug metabolism. In: GOLAN, D.E.; TASHJIAN Jr, R.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basics of Drug Therapy. 3ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. USA. 2012.
- TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5ed. London: Academic Press, 1997. p.327-352.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M.F. Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, IBGE, Rio de Janeiro, 1979. 95p.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S.; BRITO, I.S.; CHAGAS, B.R.; FRANÇA, T.N.; BRUST, L.A.G. Experimentos em bovinos com favas de *Enterolobium contortisiliquum* e *E. timbouva* para verificar propriedades fotossensibilizantes e/ou abortivas. Pesq. Vet. Bras. 19(1):39-45. 1999.

- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Plantas Tóxicas do Brasil. Helianthus: Rio de Janeiro, 2000, 310 p.
- TORRES, M.B.A.M.; COELHO, K.L.R. Foamy Macrophages in the liver of cattle fed *Brachiaria brizantha* hay. Vet. Human toxicol. v. 45, p.163-164, 2003.
- TOWERS, N. R.; STRATTON, G. C. Serum gammaglutamyltransferase as a measure of sporidesmin induced liver damage in sheep. New Zealand Veterinary Journal 26: 109-112. 1978.
- TOWERS, N.R. Mycotoxin poisoning in grazing livestock in New Zealand. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. Vol 66. 2006.
- VIANA, R.O.; BORGES, I. Ovinos na Braquiária. Revista Brasileira de Caprino & Ovinos: O berro. n.96, p.94-98, 2006.
- WISLOFF, H.; WILKINS, A.L.; SCHEIE, E.; FLAOYEN, A. Accumulation of Sapogenin Conjugates and Histological Changes in the Liver and Kidneys of Lambs Suffering from alveld, a Hepatogenous Photosensitization Disease of Sheep Grazing *Nartheccium ossifragum*. Veterinary Research Communications., v.26, p381-396, 2002.
- YAGER, S.A.; SCOOT, D.W. The skin and appendages. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals. 4ed. San Diego: Academic, 1993. v.2, cap. 5, p.531-738.
- ZHANG, S.S.; NOORDING, M.M.; RAHMAN, S.O.; HARON, M.J. The effect of zinc supplementation on antioxidant and lipid peroxidation status during *Brachiaria decumbens* intoxication in sheep. Veterinary & Human Toxicology. 43, 83–87. 2001.

CAPÍTULO II

Investigação dos mecanismos de resistência à intoxicação por *Brachiaria spp.* em ovinos.

Cristiane V. GRACINDO¹, Márcio B. CASTRO^{1*}.

RESUMO

Brachiaria spp. é a planta tóxica mais importante no Brasil Central devido a presença de saponina esteroidal que promove intoxicação hepatógena em animais, levando a ineficiência produtiva, fotossensibilização e morte. A toxicidade da *Brachiaria spp.* depende de fatores relacionados à susceptibilidade/resistência dos animais e de fatores intrínsecos da planta, conferindo diferenças significativas na manifestação clínica e mortalidade dos rebanhos mantidos em pastagens de *Brachiaria spp.* O presente trabalho investigou os mecanismos de resistência à intoxicação por *Brachiaria spp.* em ovinos por meio de três experimentos concomitantes. No primeiro experimento foi realizado o manejo adaptativo através da exposição controlada de ovinos em pastagens de *Brachiaria spp.* Foi demonstrado que a exposição dos animais à *B. decumbens* por 2 horas por dia ou em dias alternados foi capaz de proteger os animais da intoxicação durante o desafio. No experimento 2, a utilização da transfaunação ruminal foi demonstrada como uma possibilidade para transferir a resistência à intoxicação pela gramínea para animais susceptíveis. No terceiro experimento, cordeiros provenientes de matrizes oriundas de rebanhos susceptíveis, apresentaram maior morbidade à intoxicação que cordeiros de plantéis adaptados ao pastejo em *Brachiaria spp.* O conjunto de resultados dos experimentos permite sugerir que técnicas de adaptação como controle de tempo de pastoreio aliado ao processo de transfaunação, podem ser alternativas viáveis para prevenir a intoxicação pela gramínea em ovinos enquanto os animais são jovens, período de maior susceptibilidade a desenvolverem toxicidade. A seleção de rebanhos ovinos resistentes à intoxicação deve ser melhor investigada, principalmente calcada

¹Laboratório de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário (Hvet), Universidade de Brasília (UnB), Via L4 Norte, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70910-970, Brasil. *Autor para correspondência: mbcastro@unb.br.

no acompanhamento da hepatotoxicidade através dos níveis de GGT dos cordeiros introduzidos em pastagens tóxicas, para utilização somente de animais reprodutores não susceptíveis à toxina.

Palavras chaves: *Brachiaria decumbens*, saponina, manejo adaptativo, transfaunação, resistência.

ABSTRACT

Brachiaria spp. are the most important toxic plant in central-western Brazil due to the presence of steroidal saponins, cause hepatogenous poisoning in animals, leading to production inefficiencies, photosensitization and death. The toxicity of *Brachiaria* spp. depends on factors related to susceptibility / resistance of animals and intrinsic factors of the plant, providing significant differences in clinical presentation and mortality of livestock grazing the plant. The present study investigated the forms of resistance to *Brachiaria* spp. poisoning in sheep through three simultaneous experiments. The first experiment, the adaptive management, was performed by controlled exposure of sheep grazing *Brachiaria* spp. It was demonstrated that exposure of animals to *B. decumbens* for 2 hours a day or on alternate days was able to protect animals from poisoning during the challenge. In experiment 2, the use of rumen transfaunation was demonstrated as a possibility to transfer the resistance to poisoning by the grass to susceptible animals. In the third experiment, lambs originated from livestock susceptible to poisoning had higher morbidity than flocks of lambs adapted to grazing on *Brachiaria* spp. The set of results of the experiments suggest that the control of access to the paddocks of *Brachiaria* spp., allied to transfaunation process can be a viable alternative to prevent poisoning in sheep by the grass while the animals are young. The selection of resistant sheep flocks should be investigated, mainly grounded in monitoring hepatotoxicity through the levels of GGT of lambs entered in toxic pastures, and the use of breeding not susceptible animals.

Keys words: *Brachiaria decumbens*, saponin, adaptive management, rumen transfaunation, resistance.

INTRODUÇÃO

Brachiaria spp. é considerada a planta tóxica mais importante no Brasil Central (FURLAN et al. 2012, PESSOA et al. 2013). A utilização de pastagens formadas por essa gramínea é um importante limitador na produção de ruminantes devido à presença de saponinas esteroidais contidas no capim, capazes de provocar intoxicação hepatógena, fotossensibilização e morte (CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011). Os ovinos jovens são considerados mais susceptíveis à intoxicação por *Brachiaria* spp. que outros ruminantes (LEMOS et al. 1998, SANTOS et al. 2008, RIET-CORREA et al. 2011), ocasionando elevada mortalidade e letalidade dos animais (MUSTAFA et al. 2012), observada durante todos os meses do ano (RIET-CORREA & MENDEZ 2007).

No Brasil, nos últimos 30 anos, a intoxicação por *Brachiaria* spp. apresentou notável declínio na sua importância em bovinos, provavelmente devido a morte de animais susceptíveis dos rebanhos e pela utilização de espécies de plantas conhecidamente menos tóxicas, como a *B. brizantha* e *B. humidicola* (RIET-CORREA et al. 2011). O manejo do rebanho evitando o pastejo de animais jovens e a utilização de pastagens durante a fase de brotação, estágio de maior toxicidade da gramínea, também pode ter contribuído para a redução de casos da intoxicação (CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011).

Em contrapartida, na última década a Região Centro-Oeste apresentou aumento da ocorrência de intoxicação pela gramínea em ovinos, atribuído à importação de animais de áreas livres de *Brachiaria* spp. (FACCIN et al. 2014). Porém, a manutenção de ovinos jovens e sem apresentarem problemas de hepatotoxicidade em piquetes de *Brachiaria* spp., provenientes de rebanhos previamente adaptados ao pastejo na gramínea, demonstrou a possibilidade da utilização segura da gramínea (GRACINDO et al. 2014).

O conhecimento sobre plantas tóxicas em todo o mundo vem avançando nos últimos 20 anos, com uma considerável melhoria na compreensão dos princípios ativos, mecanismos de ação e formas de prevenção das intoxicações. No entanto, ainda pouco se conhece quanto aos mecanismos de adaptação e resistência dos animais frente aos princípios tóxicos de plantas e formas de reduzir seu impacto nos rebanhos. A toxicidade da *Brachiaria* spp. depende de fatores relacionados à susceptibilidade/resistência dos animais e de fatores intrínsecos da planta, conferindo diferenças significativas na manifestação clínica e mortalidade dos rebanhos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. (CASTRO et al. 2011).

O presente trabalho teve como objetivo investigar as formas de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos através da exposição controlada de animais susceptíveis à pastagens tóxicas, uso da transfaunação como forma de transferência de resistência e a avaliação da herdabilidade de características que confirmam susceptibilidade e não-susceptibilidade à toxicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos entre janeiro e maio de 2012, na Fazenda Água Limpa (FAL) - Universidade de Brasília, a 15°47'S e 47°56'W, a 1080 m de altitude, Brasília DF. O período experimental foi de 120 dias (dezesseis semanas).

Foram efetuados três experimentos concomitantes: Experimento 1 – indução da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. através do manejo adaptativo de ovinos; Experimento 2 – transferência da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. por transfaunação ruminal e Experimento 3 – avaliação da transferência hereditária da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp.

Para os experimentos 1 e 2 foram utilizados ovinos machos, não castrados, mestiços, com 4 a 5 meses de idade, susceptíveis à intoxicação, provenientes de rebanhos que nunca tiveram contato com pastagens de *Brachiaria* spp. (CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011, GRACINDO et al. 2014). Para o experimento 3 foram utilizados ovinos machos e fêmeas, não castrados, mestiços, com quatro meses de idade, metade proveniente de rebanhos susceptíveis à intoxicação e o outro grupo, animais adaptados ao pastejo em *Brachiaria* spp. (RIET-CORREA et al. 2011, GRACINDO et al. 2014).

Os pastos utilizados nos experimentos foram *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria humidicula* com as plantas em brotação, considerada a fase mais tóxica das gramíneas (RIET-CORREA et al. 2011, GRACINDO et al. 2014, LIMA et al. 2012). Os piquetes foram roçados trinta dias antes do experimento para garantir a brotação da pastagem na entrada dos animais. Os ovinos foram mantidos a uma taxa de lotação de 0,5UA/ha (CARVALHO et al. 2005, SANTOS et al. 2011), com suplementação de 1% PV de concentrado comercial para ovinos, acesso a água e sal mineralizado *ad libitum* (PORTO et al. 2013). Os animais eram recolhidos dos piquetes para abrigos cobertos durante a noite. Nos experimentos onde os animais permaneceram confinados nas baias cobertas, receberam suplemento a base de feno de *costcross* (*Cynodon* spp.).

O exame clínico dos ovinos foi realizado semanalmente, com a avaliação do estado geral, da pele, das mucosas oral, retal e ocular. Concomitantemente, foram colhidas amostras de sangue para a obtenção de soro e mensuração dos níveis séricos das enzimas gama-glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) (MUSTAFA et al. 2012, PORTO et al. 2013, GRACINDO et al. 2014). Elevações dos níveis séricos de GGT e AST foram consideradas quando atingiam valores superiores ao valor máximo de referência da população (VMRP), estimados a partir dos níveis séricos médios de todos os animais utilizados no experimento, antes do início do período experimental, somado a duas vezes o desvio padrão (STOCKHAM & SCOTT 2008).

Os animais que apresentaram sinais da intoxicação foram imediatamente retirados do experimento para evitar sofrimento e agravamento do quadro. Os animais que morreram intoxicados foram submetidos à necropsia e colhidos fragmentos de órgãos e tecidos para avaliação histopatológica. As amostras foram fixadas em formol

a 10%, incluídas em parafina, realizados cortes de cinco micrometros, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscopia de luz.

Amostras de cada pastagem foram colhidas quinzenalmente, a cerca de dois centímetros do solo em 10 áreas aleatórias de 1m² para determinação do teor de saponinas conforme proposto por Ganzera et al. (2001) e Oleszek (2002), e para contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* conforme metodologia proposta por DiMenna & Bailey (1973).

Os dados foram apresentados na forma de médias e desvio padrão (DP), analisados no programa PrismGraph 6.01². Nos experimentos foi feita a comparação das médias das atividades séricas enzimáticas de GGT e AST pelo método ANOVA e teste de Tukey. No experimento 3, foi realizado Teste T para comparação das frequências de elevação de GGT e AST.

Experimento 1 – Indução de resistência à *Brachiaria* spp. através do manejo adaptativo de ovinos.

Foram utilizados 45 ovinos distribuídos em cinco grupos de nove animais cada (n=9). Foram utilizados piquetes distintos formados por *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria humidicula*. O experimento foi conduzido em duas fases: adaptação e desafio. A primeira fase (adaptação) transcorreu por 60 dias, quando os grupos foram submetidos aos diferentes tratamentos (Tabela 1).

Imediatamente ao término do manejo adaptativo, os ovinos foram desafiados (segunda fase), submetidos ao pastejo contínuo em piquete *B. decumbens* em brotação durante 60 dias, para avaliar a eficácia do processo de adaptação. O grupo BDc foi introduzido apenas na fase de desafio como controle para a intoxicação.

Tabela 1. Formas de manejo estabelecidos de acordo com os grupos no Experimento 1 - Brasília, 2012.

GRUPO	N	FORMAS DE MANEJO
BD2h	9	2h diárias em <i>B. decumbens</i>
BDalt	9	Dias alternados em <i>B. decumbens</i>
BBc	9	Contínuo em <i>B. brizantha</i>
BHc	9	Contínuo em <i>B. humidicula</i>
BDc	9	Grupo controle. Contínuo em <i>B. decumbens</i>

Experimento 2 - Transferência da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. por transfaunação ruminal.

O experimento foi dividido em duas fases, realizado com 24 ovinos machos distribuídos em três grupos de oito animais cada (n=8). Na fase inicial, os animais foram submetidos aos tratamentos durante 60 dias e mantidos em piquete formado exclusivamente por *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

² GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, Estados Unidos.

O grupo TRU recebeu uma única transfaunação. Os animais do grupo TRC foram transfaunados três vezes por semana durante todo o período, e o grupo controle (CT), não recebeu nenhum tratamento. O conteúdo ruminal foi coletado de 12 ovinos adultos adaptados ao pastejo em *Brachiaria* spp. e previamente fistulados (MUZZI et al. 2009, DUARTE et al. 2013). A transfaunação consistiu na transferência de 800ml de líquido ruminal fresco dos animais adultos adaptados para os animais susceptíveis via sonda esofágica (ALBERNAZ et al. 2010, DUARTE et al. 2013). A coleta do conteúdo ruminal foi feita através da abertura das fístulas e retirada a sua porção líquida. A transferência para os animais susceptíveis foi feita imediatamente após a coleta.

Imediatamente após o término do período dos tratamentos, todos os ovinos foram para a fase de desafio, submetidos ao pastejo contínuo em piquete de *B. decumbens* em brotação por 60 dias.

Experimento 3 – Avaliação da transferência hereditária da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp.

Foram utilizados 18 ovinos jovens, divididos em dois grupos (n=9), criados desde o nascimento em baias fechadas até o início do experimento. Esses animais foram provenientes de 18 fêmeas ovinas selecionadas no terço final de gestação, mantidas em baias fechadas até a parição e amamentação.

O grupo de cordeiros de rebanhos susceptíveis (CRS) foi constituído por animais nascidos de fêmeas originadas de rebanhos não adaptados ao pastejo em *Brachiaria* spp. O grupo de cordeiros de rebanhos adaptados (CRA) foi formado a partir de fêmeas oriundas de criatórios adaptados e mantidos por no mínimo três anos consecutivos nesse tipo de pastagem e com ausência ou rara ocorrência de casos de intoxicação no período (CASTRO et al. 2011, RIET-CORREA et al. 2011, GRACINDO et al. 2014). Os dois grupos de cordeiros foram submetidos ao pastejo em *B. decumbens* por 60 dias, para determinar a existência de diferenças entre os grupos quanto à susceptibilidade à intoxicação por *Brachiaria* spp.

RESULTADOS

A concentração média de protodioscina (%) na matéria seca nas amostras de *B. decumbens* na primeira fase foi $0,624 \pm 0,18$ e na fase de desafio $1,185 \pm 0,10$ em todos os experimentos. *B. brizantha* foi $0,744 \pm 0,23$. *B. humidicola* foi $0,113 \pm 0,01$. A contagem de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* foi menor que 5.000 esporos/g na pastagem *B. decumbens* e zero esporos/g de pastagem fresca das outras amostras.

Experimento 1 – Indução de resistência à *Brachiaria* spp. através do manejo adaptativo de ovinos:

Três ovinos do grupo BDc apresentaram discreta icterícia, apatia, emagrecimento, hiperemia e secreção mucoide ocular e elevação sérica das enzimas GGT e AST, quando desafiados no pastejo em piquete de *B. decumbens*. Os animais foram retirados do piquete, porém dois morreram em decorrência à intoxicação e um sobreviveu e apresentou lesões cutâneas de fotossensibilização (Figura 1) e manteve taxa alta de enzimas hepáticas por mais cinco semanas.

Após uma semana do início da fase de desafio, um animal do grupo BBc foi afastado do experimento com elevação sérica severa de GGT, AST e sinais clínicos semelhantes aos dos outros animais e morreu. A morbidade do grupo BDc foi de 33,3% e letalidade de 66,6%. A morbidade do grupo BBc foi de 11% e letalidade de 100%. Nos demais grupos, nenhum animal adoeceu.

Na fase de desafio em *B. decumbens* os grupos BDc, BBc e BHc demonstraram elevações séricas de GGT e AST. A atividade média sérica de GGT e AST foi maior nos animais do grupo BDc em comparação aos grupos BD2h e BDalt ($p < 0,05$).

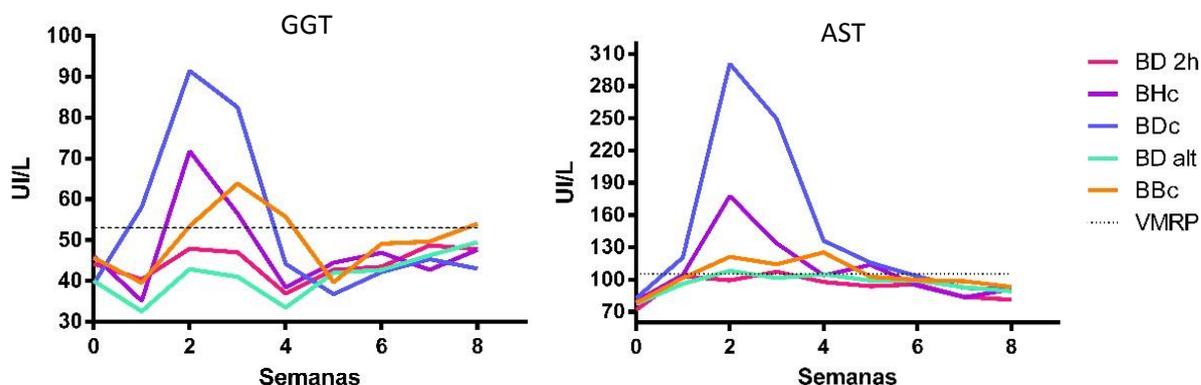


Figura 2. Taxas séricas médias de GGT e AST de ovinos submetidos ao pastejo em *Brachiaria decumbens* por duas horas diárias (BD2h), pastejo em dias alternados *Brachiaria decumbens* (BDalt), pastejo contínuo em *Brachiaria decumbens* (BDc), pastejo contínuo em *Brachiaria humidicula* (BHc), e pastejo contínuo em *Brachiaria brizantha* (BBc) durante o Experimento 1. Valor máximo de referência da população (VMRP) para espécie. - Brasília, 2012.

Os animais que morreram apresentaram fígado de coloração discretamente amarelada, hepatomegalia e vesícula biliar repleta. No fígado foi observada tumefação de hepatócitos, muitos macrófagos com citoplasma espumoso no interior de sinusóides (Figura 3), alguns com imagens negativas de cristais aciculares intracitoplasmáticos, colestase e infiltrado inflamatório periportal mononuclear discretos, e imagens negativas de material cristalóide refringente no lúmen de ductos biliares.

Experimento 2 - Transferência da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. por transfaunação ruminal.

Um ovino do grupo CT apresentou elevação da atividade sérica de GGT e AST, emagrecimento progressivo, apatia, desidratação, secreção e hiperemia de mucosa ocular e na terceira semana da fase de desafio morreu. As alterações patológicas foram similares às observadas nos ovinos intoxicados do experimento 1. Os demais animais não apresentaram alterações clínico-patológicas dignas de nota durante o período experimental. A morbidade do grupo CT foi de 12,5% e letalidade de 100%.

A atividade sérica média de GGT e AST (Tabela 2) foram maiores nos animais do grupo CT em comparação aos grupos TRU e TRC durante a fase de desafio ($p < 0,05$).

Tabela 2. Níveis séricos médios de GGT e AST dos grupos durante a fase de desafio no Experimento 2 - Brasília, 2012.

Grupos	GGT		AST	
	Média e DP	ASV (n=8)	Média e DP	ASV (n=8)
CT	53,9±7,3a	4	110±12,3a	5
TRU	46,8±4,8b	2	98,3±11,0b	2
TRC	45,7±5,5b	1	101,3±6,4b	2

Médias com letras distintas em uma mesma coluna diferem entre si ($P \leq 0,05$). Número de animais com aumento sérico enzimático acima do VMRP (ASV). Grupo controle (CT), grupo com transfaunação única (TRU) e grupo com transfaunação contínua (TRC).

Experimento 3 – Avaliação da transferência hereditária da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp.

Três animais do grupo CRS apresentaram sinais clínicos da intoxicação (morbidade = 33,3%). Um deles adoeceu na quarta semana após o início do experimento, e os outros dois, na quinta e sétima semanas. Esses animais apresentaram emagrecimento, hiperemia da mucosa ocular, lacrimejamento e edema de face. Os ovinos foram retirados do experimento e se recuperaram das lesões. Os cordeiros do grupo CRA não apresentaram sinais clínicos de intoxicação.

Os níveis séricos médios de GGT (CRS= 65,2±18,8 UI/l e CRA=56,0±7,4 UI/l) e AST (CRS=248,1±416,3 UI/l e CRA=127,2 ±32,7 UI/l) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 4) nas semanas de maior elevação e durante todo o experimento ($p > 0,05$). Nos períodos de maior atividade sérica média de AST, essas elevações foram decorrentes de variações acentuadas apresentadas pelos 3 animais do grupo CRS que adoeceram e que também apresentaram alterações nos níveis de GGT. Apenas dois ovinos do grupo CRA produziram o aumento do GGT sérico na sexta semana, apesar de não apresentarem sinais clínicos ou adoecerem.

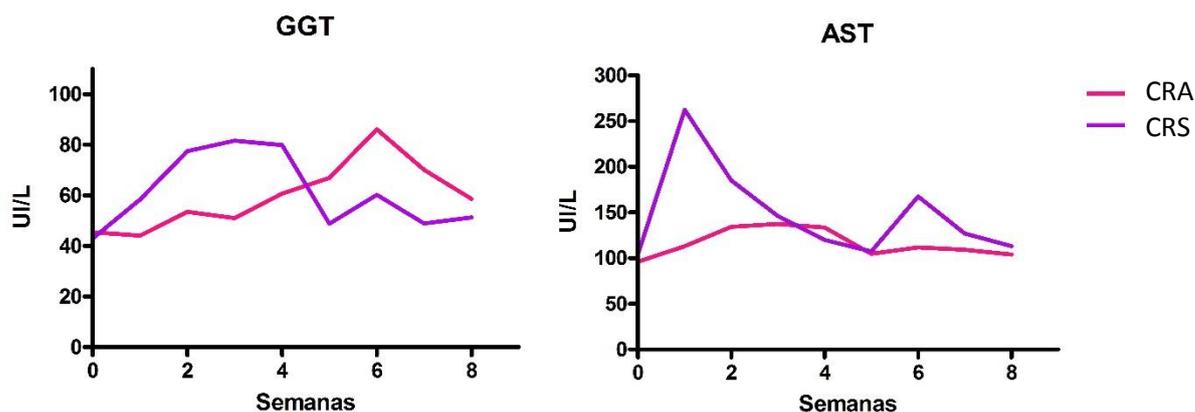


Figura 4. Taxas séricas médios de GGT e AST de cordeiros suscetíveis (CRS) e adaptados (CRA) submetidos ao pastejo em *Brachiaria decumbens* durante o Experimento 3. - Brasília, 2012.

DISCUSSÃO

Nos três experimentos realizados, oito ovinos se intoxicaram e quatro morreram. Destes, sete animais eram provenientes de rebanhos não adaptados ao pastejo em *Brachiaria* spp. e não foram submetidos à nenhuma forma de manejo ou tratamento. Ovinos que nunca tiveram contato com a planta (não adaptados) são mais suscetíveis à intoxicação do que animais criados e mantidos (adaptados) em pastagens de *Brachiaria* spp. (CASTRO et al. 2011, GRACINDO et al. 2014, FACCIN et al. 2014).

Na intoxicação natural e experimental de ovinos pela gramínea, os índices de morbidade podem variar de 15,4 a 50% e os índices de letalidade de 29,4 a 88,3% (MUSTAFA et al. 2012, CASTRO et al. 2011, BRUM et al. 2007, SANTOS Jr 2008). Grandes variações nesses índices podem ocorrer devido às características das pastagens e seu teor de saponina, e fatores ligados aos animais como idade e diferenças na suscetibilidade/resistência presente nos ovinos dos rebanhos (CASTRO et al. 2011).

Os sinais clínicos observados nos animais intoxicados nos experimentos são frequentemente encontrados em surtos e na intoxicação experimental de ovinos (GRAYDON et al. 1991, BRUM et al. 2007, LEMOS et al. 1997, MUSTAFA et al. 2012, PORTO et al. 2013, GRACINDO et al. 2014), e refletem principalmente a atividade hepatotóxica provocada pela ingestão da gramínea no organismo animal.

Importante ressaltar que apenas um animal do grupo BDc (experimento 1) apresentou fotossensibilização hepatógena com alopecia e ulcerações cutâneas em áreas de pelagem clara (GRAYDON et al. 1991, LEMOS et al. 1996, SATURNINO et al. 2010). Os ovinos utilizados nos experimentos eram mestiços da raça Santa Inês, e apresentavam em sua maioria, pelagem escura, o que justificaria o surgimento de apenas um animal com lesões de fotossensibilização.

As alterações anatomopatológicas apresentadas pelos animais intoxicados demonstraram a ação hepatotóxica causada pela ingestão de *Brachiaria* spp., representada principalmente pela hepatomegalia, fígado de coloração amarelada e vesícula biliar distendida, repleta de conteúdo biliar espesso (GRAYDON et al. 1991, KHAIRI et al. 2000, CASTRO et al. 2011, FACCIN et al. 2014).

As alterações histopatológicas, em conjunto às manifestações clínico-patológicas, são essenciais para confirmar o diagnóstico da intoxicação, e estavam presentes nos ovinos do experimento que morreram intoxicados. Todos apresentaram lesões características da intoxicação, determinadas pela presença de macrófagos com citoplasma espumoso no interior de sinusóides hepáticos, tumefação de hepatócitos, imagens negativas de cristais aciculares intracitoplasmáticos em macrófagos e no lúmen de ductos biliares, colestase e infiltrado inflamatório periportal mononuclear (GRAYDON et al. 1991, DREIMEIER et al. 1998, 2002, CRUZ et al. 2000).

As alterações patológicas encontradas nos ovinos intoxicados são decorrentes principalmente à ação da protodioscina, uma saponina esteroideal isolada das folhas de *Brachiaria* spp. (HARAGUCHI et al. 2008, BARBOSA-FERREIRA et al. 2011), considerada o princípio tóxico presente na gramínea (MILES et al. 1993, GRAYDON et al. 1991, SALAM ABDULLAH et al. 1992, MEAGHER et al. 1996, LEMOS et al. 1997, CRUZ et al. 2001). Ao sofrer conjugação ao ácido glicurônico para formar sapogeninas ligadas com os íons de cálcio (MILES et al. 1991, 1992, 1993, CRUZ et al. 2000), que leva a formação de sais insolúveis que se depositam nos ductos biliares na forma de cristais (GRAYDON et al. 1991, MEAGHER et al. 1996, CRUZ et al. 2000). A ação física dos cristais formados é responsável por promover obstrução e inflamação do sistema biliar, icterícia, fotossensibilização, necrose de hepatócitos e hepatite (LEMOS et al. 1998, SANTOS et al. 2008).

Os oito animais susceptíveis que se intoxicaram, apresentaram elevação sérica das enzimas GGT e AST. A análise de atividade séria de GGT vem sendo amplamente utilizada como marcador fenotípico de lesão hepática em ovinos, relacionada com a severidade da lesão causada pela intoxicação por esporodesmina (TOWERS & STRATTON 1978, MORRIS et al. 1991, 1994). Os níveis séricos de GGT também são considerados importantes na identificação de animais intoxicados por *Brachiaria* spp. (GRACINDO et al. 2014, FACCIN et al. 2014) e por *Senecio* spp. (BARROS et al. 2007, GIARETTA et al. 2014).

A análise dos níveis séricos de GGT e AST do experimento de manejo adaptativo (experimento 1), demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos BDalt e BD2h quando comparados ao grupo BDc, e permite inferir que a forma de pastejo controlado em *B. decumbens* contribui com a adaptação dos animais. A manutenção contínua de ovinos jovens em pastagens com níveis altos de saponina, como presente na *B. decumbens*, favorecem a intoxicação dos animais e aparentemente não contribuem para sua adaptação a pastagem.

Os animais do experimento submetidos ao pastejo nos piquetes de *B. brizantha* e *B. humidicula*, apesar de não apresentarem diferenças significativas em relação aos

outros grupos, no período de desafio, também mostraram aumentos séricos similares entre si, principalmente de GGT. Os níveis séricos de GGT como indicador de hepatotoxicidade da gramínea (TOWERS & STRATTON 1978, MORRIS et al. 1991, 1994, 2002), sugerem que essas formas de manejo não são eficazes na adaptação dos animais ao pastejo em *B. decumbens*.

A administração continuada de doses não tóxicas de *Enterolobium contortisiliquum*, *Crotalaria retusa* e *Senecio brasiliensis* podem induzir resistência à intoxicação em ovinos, que desaparece após a retirada da planta, devido à degradação lisossomal das enzimas responsáveis pela detoxificação (TOKARNIA et al. 1999, ANJOS et al. 2010, GRECCO et al. 2012).

Os achados do experimento 1 sugerem que o pastejo controlado em piquetes de *B. decumbens* é capaz de fornecer pequenas doses de saponina, sem causar toxicidade. Essa forma de manejo possivelmente estimule a capacidade de metabolização hepática da toxina, reduzindo a ação tóxica da gramínea quando os ovinos foram desafiados.

No experimento de transferência da resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. através da transfaunação (experimento 2), o grupo controle (CT) apresentou elevação dos níveis séricos de GGT e AST ($p < 0,05$) quando comparado aos animais transfaunados (TRU e TRC). Isso permite inferir que a resistência à intoxicação pode ser transferida para animais susceptíveis através da administração de conteúdo rumenal de animais adaptados ao pastejo na gramínea.

A administração de conteúdo ruminal de ovinos adultos adaptados ao pastejo em *B. brizantha* para cordeiros susceptíveis foi capaz de reduzir a taxa de morbidade da intoxicação pela gramínea no rebanho, possivelmente por auxiliar na degradação dos compostos tóxicos (ALBERNAZ et al. 2010). A transfaunação pode ser utilizada para detoxificar metabólitos tóxicos de plantas através dos microrganismos presentes no conteúdo ruminal (DePETERS & GEORGE 2014). Bactérias rumenais capazes de degradar o monofluoracetato de sódio podem ser transfaunadas para conferir resistência para animais susceptíveis, à intoxicação por *Amorimia septentrionalis*, *A. rígida* e *Palicourea aneofusca* (CAMBOIM et al. 2012, DUARTE et al. 2013, OLIVEIRA et al. 2013).

A mimosina, princípio tóxico presente em plantas do gênero *Leucaena* e *Mimosa* e o tanino contido em plantas, são degradados por bactérias rumenais em animais adaptados à sua ingestão, e podem ser transferidas por transfaunação para mitigar o impacto da intoxicação por essas substâncias em ruminantes não adaptados (JONES & MEGARRITY 1986, ODENYO et al. 2001, EPHRAIM et al. 2005).

As saponinas presentes na *Brachiaria* spp. tornam-se tóxicas após a metabolização pela microbiota ruminal (NOORDIN et al. 1989, SALAM ABDULLAH et al. 1992) formando epismilagenina e episarsasapogenina, consideradas responsáveis pela toxicidade e formação dos cristais característicos no fígado (LAJIS et al. 1993, CRUZ et al. 2000, MEAGHER et al. 2001). A administração de conteúdo ruminal de ovinos intoxicados por *B. decumbens* para bovinos é capaz de produzir toxicidade, com o desenvolvimento de lesões hepáticas e renais (NOORDIN et al. 1989).

Entretanto, experimentalmente a análise do conteúdo ruminal uma hora após a oferta de saponina demonstrou a ausência de compostos derivados da diosgenina, sugerindo que há hidrólise de forma muito rápida das saponinas no rúmen (MEAGHER et al. 2001).

É conhecida a metabolização rumenal das saponinas contidas na *Brachiaria* spp. para a formação de compostos tóxicos, porém, a transfaunação de líquido rumenal de animais adaptados para ovinos susceptíveis à intoxicação pode ser considerada uma forma de transferência de resistência. Os resultados sugerem que haja microorganismos rumenais em ovinos adaptados, capazes de auxiliar na degradação ou inativação das saponinas da gramínea, diminuindo sua toxicidade. A detoxicação microbiana do rúmen, pela adaptação gradual da microflora ruminal aos princípios tóxicos presentes nas plantas, pode ser utilizada como forma de controle e prevenção das intoxicações (RIET-CORREA & MEDEIROS 2001).

No experimento de transferência hereditária de resistência à intoxicação pela gramínea (experimento 3) não foram encontradas diferenças significativas nos níveis séricos de GGT e AST entre os grupos ($p > 0,05$), porém três cordeiros do grupo susceptível se intoxicaram (morbidade de 33%), enquanto nenhum animal do grupo adaptado adoeceu. Todos os animais intoxicados apresentaram GGT e AST maiores do que os demais ovinos. Esses achados sugerem que em rebanhos adaptados, os reprodutores apresentam mecanismos de resistência ao pastejo em *B. decumbens* que podem ser herdados pelos cordeiros descendentes.

A transmissão de resistência à toxinas por herdabilidade é apontada como um mecanismo importante para explicar a enorme variação que existe nos níveis de suscetibilidade dos animais frente às intoxicações (TOWERS 2006, BISHOP & MORRIS 2007). A seleção de rebanhos resistentes e minimizar a utilização de pastos com presença de esporidesmina são consideradas as principais medidas no controle do eczema facial em ovinos (MORRIS et al. 1991, MORRIS 2009).

A seleção de linhagens de ovinos resistentes ao eczema facial foi desenvolvida na Nova Zelândia (MORRIS et al. 1998) e já são encontrados rebanhos comerciais selecionados com essa característica naquele país (BISHOP & MORRIS 2007). A herdabilidade das características de resistência à intoxicação por esporidesmina possuem taxa de transferência 1,77 vezes mais rápido do que o rebanho susceptível tende a se tornar mais susceptível (MORRIS et al. 1994).

A resistência à intoxicação pelo endófito do capim festuca, *Festuca arudinacea*, também pode ser transmitida geneticamente para bovinos e ratos pela seleção dos animais resistentes (GOULD & HOHENBOKEN et al. 1993, MILLER et al. 1994, HOHENBOKEN & BLODGETT 1997, HOHENBOKEN et al. 2000, WOOD et al. 2006).

Dentre os principais mecanismos envolvidos na resistência dos animais à intoxicação por plantas, é importante considerar as vias de detoxicação hepática (FLAOYEN & JENSEN 1991). O sistema citocromo P450 (CYP), constituído por enzimas localizadas na superfície do Retículo Endoplasmático Liso (REL) dos hepatócitos, é considerado um dos mais importantes sistemas de detoxificação, onde ocorre a oxidação e metabolização de diversas substâncias (OLIVEIRA et al. 2006,

TANIGUCHI & GUENGERICH 2012). As reações mediadas pelo CYP respondem pela maior parte das metabolizações oxidativas de moléculas lipofílicas e esteroidais (BISCHOFF & RAMAIAH 2007, TANIGUCHI & GUENGERICH 2012).

A hiperplasia de REL é descrita em bovinos (DRIEMEIER et al. 1998) e ovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. e em animais intoxicados (DRIEMEIER et al. 2002, SANTOS Jr 2008). Considerando que as saponinas presentes na *Brachiaria* spp. são compostos de parte lipofílica (sapogeninas) e porção hidrofílica de cadeias de açúcares (SANTOS et al. 2000), possivelmente a resposta de hiperplasia do REL nos hepatócitos reflita o aumento na metabolização hepática frente a toxina de natureza esteroidal.

A administração de fenobarbital para ovinos, potente indutor da citocromo P-450, retardou a intoxicação por *Brachiaria decumbens* e reduziu a severidade dos sinais clínicos em comparação àqueles que não receberam a droga (HASIAH et al. 2000). Essa droga é capaz de induzir enzimas da fase 1 e fase 2 de detoxificação hepática, especialmente a CYP3A1 (EJIRI et al. 2005). Foi demonstrado que ovinos intoxicados por *B. decumbens* apresentam uma redução da citocromo P450 e de outras enzimas microsossomais no fígado e rins, diminuindo a capacidade de metabolização e detoxificação de substâncias (KHAIRI et al. 2000). A resistência às plantas que contém saponinas parece estar ligada a maior atividade daquele sistema enzimático (FLAOYEN & JENSEN 1991). Estas observações demonstram que o REL e seu sistema enzimático podem representar um papel central na detoxificação das saponinas presentes na gramínea.

O sistema citocromo P450, representado pela expressão e atividade das CYPs no metabolismo de detoxificação, pode apresentar grande variabilidade individual, explicada pela característica genética polimórfica das enzimas determinando a susceptibilidade hospedeiro-específica (MILLER et al. 1997, SMITH et al. 1998, GÓMEZ-LECHÓN et al. 2007, HELLER 2013). Apesar das diferenças existentes entre as CYPs, sua relevância e atividade em várias espécies (GÓMEZ-LECHÓN et al. 2007, BAILLIE & RETTIE 2011), foi também demonstrada a importância das isoenzimas CYP2B e CYP3A em ovinos na metabolização de drogas (GALTIER & ALVINERIE 1996) e na bioativação e detoxicação de alcaloides pirrolizidínicos (HUAN et al. 1998).

O sistema enzimático microsossomal é mais desenvolvido em animais adultos que em indivíduos jovens (FREELAND & JANZEN 1974), aumentando gradualmente a atividade das CYPs desde o nascimento até a fase adulta (GALTIER & ALVINERIE 1996). Essas observações reforçam o fato que ovinos jovens são considerados mais susceptíveis à intoxicação por *Brachiaria* spp. que animais adultos (LEMONS et al. 1998, CASTRO et al. 2011, SANTOS et al. 2008). O processo de maturação do sistema enzimático microsossomal possivelmente explique a maior suscetibilidade de ovinos jovens à intoxicação pela gramínea.

O conjunto de experimentos foi capaz de demonstrar que ovinos podem apresentar diferentes mecanismos de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. O pastejo controlado de animais jovens susceptíveis à intoxicação permitiu a

administração de doses não tóxicas de saponinas presentes na gramínea. Os intervalos utilizados foram suficientes para evitar que os ovinos se intoxicassem, possivelmente devido à hiperplasia do REL e do aumento da atividade das enzimas do sistema P450, minimizando a ação hepatotóxica durante a fase de desafio, demonstrada pelos níveis menores de GGT.

A transfaunação de conteúdo rumenal de animais resistentes à intoxicação para ovinos susceptíveis, também parece ser uma forma importante de transferência de resistência, pois minimizou as lesões hepáticas, comprovada pela redução dos níveis de GGT.

A herdabilidade de mecanismos de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. também parece ocorrer, uma vez que cordeiros provenientes de rebanhos adaptados ao pastejo na gramínea, não se intoxicaram. Esse mecanismo herdado envolvido na resistência, ainda não é conhecido, mas possivelmente esteja ligado à capacidade de metabolização hepática influenciada pelo perfil de expressão das CYPs, capazes de metabolizar adequadamente maiores quantidades da toxina.

No entanto, 66,6% dos cordeiros susceptíveis também não se intoxicaram e isso poderia ser explicado por outros fatores como o polimorfismo dos genes que expressam as CYPs, e variação nos níveis de saponina nas pastagens, além do fenômeno de resiliência. Esse fenômeno foi apresentado por animais de ambos os grupos que apresentaram elevações séricas de GGT e AST, mas não exibiram sinais clínicos.

Dessa forma, o manejo adequado de ovinos jovens, controlando o tempo de acesso aos piquetes de *Brachiaria* spp. pode ser uma alternativa viável para prevenir a intoxicação pela gramínea, permitindo ao mesmo tempo que o sistema de enzima microsossomais aumente sua atividade pela estimulação contínua mas não tóxica, e também pela maturação desse sistema à medida que o animal envelhece. O processo de transfaunação, aliado ao acesso controlado aos piquetes deve contribuir para acelerar o processo de adaptação dos animais susceptíveis, minimizando às intoxicações. A seleção de rebanhos ovinos resistentes à intoxicação deve ser melhor investigada, principalmente calcada no acompanhamento dos níveis de GGT dos cordeiros introduzidos em pastagens tóxicas, para utilização somente de animais reprodutores não susceptíveis à toxina.

Os resultados permitem apontar na direção de um manejo controlado de animais susceptíveis numa fase inicial de transição para a seleção de rebanhos resistentes à intoxicação. É importante um olhar crítico para o futuro, visando identificar animais resistentes, entender melhor como e quais mecanismos são responsáveis e o desenvolvimento de testes moleculares para identificar os genes ligados à resistência/susceptibilidade. O estudo toxicogenômico da intoxicação por braquiária encontra-se na fronteira do conhecimento para o entendimento da ação de diversas outras plantas, toxinas e drogas hepatotóxicas, com ampla aplicação nas mais diversas espécies, incluindo o homem.

Agradecimentos - A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado. Projeto de pesquisa financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o Controle das Intoxicações por Plantas (Proc. CNPq 573534/2008-0).

ANEXOS



Figura 1. Lesões de fotossensibilização na face (A) e membro torácico (B) em ovino submetido ao pastejo contínuo em *Brachiaria decumbens* no Experimento 1 - Brasília, 2012.

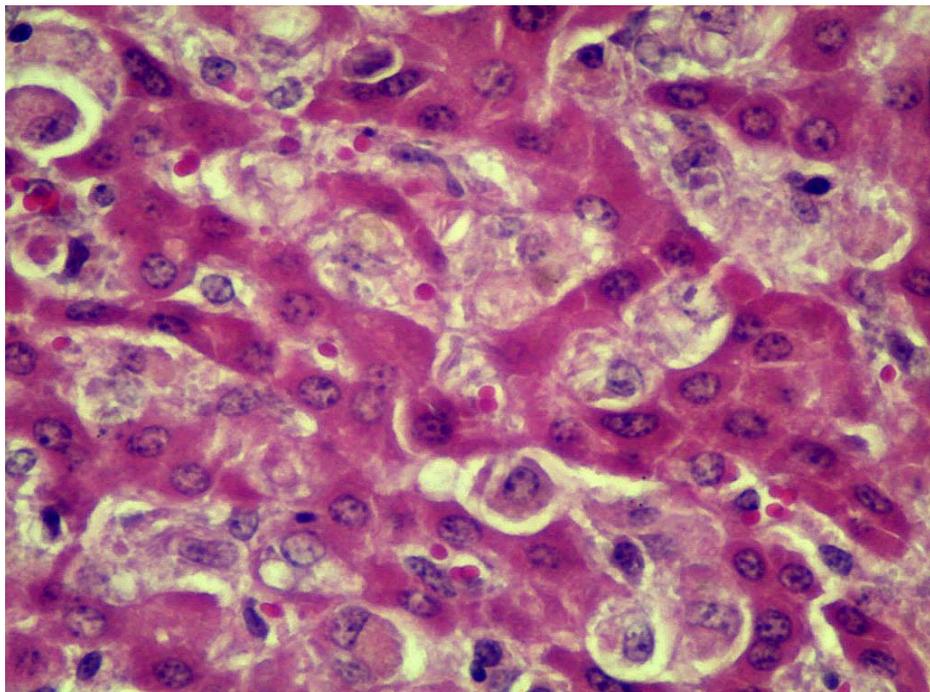


Figura 3. Hepatócitos vacuolizados e presença de macrófagos espumosos. Fígado de ovino intoxicado após duas semanas de pastejo contínuo em *Brachiaria decumbens*. HE, obj. 40x.

REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, T.T.; SILVEIRA, J.A.S.; SILVA, N.S.; OLIVEIRA, C.H.S.; BELO REIS, A.S.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira 30(9):741-748. 2010.
- ANJOS, B.L.; NOBRE, V.M.T.; DANTAS, A.F.M.; MEDEIROS, R.M.T.; OLIVEIRA, NETO T.; MOLYNEUX, R.J.; RIET-CORREA, F. Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: Acquired resistance by continuous administration of low doses. Toxicon 55:28-32. 2010.
- BAILLIE, T.A.; RETTIE, A.E. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: Influence of intra- and inter-species in drug metabolism. Drug Metab. Pharmacokinet. 26(1): 15-29. 2011.
- BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K.B.; FERNANDES, C.E.S.; MARTINS, C.F.; MONTEIRO, L.C.; REZENDE, K.G.; RIET-CORREA, F.; HARAGUCHI, M.; WYSOCKI JUNIOR, H.L.; LEMOS, R.A.A. Variations of saponin level x maturation in *Brachiaria brizantha* leaves. In: RIET-CORREA F.; PISTER J.; SCHILD A.L.; WIERENGA T. (Eds). Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins. CAB International, London. p.118-123. 2011.
- BARROS, C.S.L.; CASTILHOS, L.M.L.; RISSI, D.R.; KOMMERS, G.D.; RECH, R.R. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 27:53-60. 2007.
- BISCHOFF, K.; RAMAIAH, S. Liver toxicity. In: GUPTA, R.C. Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles. Ed. Elsevier. 1ed. New York. USA. 145-160. 2007.
- BISHOP, S.C.; MORRIS, C.A. Genetics of disease resistance in sheep and goats. Small Ruminant Research 70. 48–59. 2007.
- BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M.C.S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. Pesq. Vet. Bras. 27(1):39-42. 2007.
- CAMBOIM, E.K.A.; ALMEIDA, A.P.; TADRA-SFEIR, M.Z.; JUNIOR, F.G.; ANDRADE, P.P.; MCSWEENEY, C.S.; RIET-CORREA, F. & MELO, M.A. Isolation of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. Scientific World Journal. Article ID 178254, 6 pages. 2012.

- CARVALHO, P.C.F.; SANTOS, D.T.; BARBOSA, C.M.P.; LUBISCO, D.S.; LANG, C.R. Otimizando o uso da pastagem pela integração de ovinos e bovinos. Anais do ZOOTEC'2005. Campo Grande MS. 2005.
- CASTRO, M.B.; SANTOS Jr., H.L.; MUSTAFA, V.S.; GRACINDO, C.V.; MOSCARDINI, A.C.R.; LOUVANDINI, H.; PALUDO, G.R.; BORGES, J.R.J.; HARAGUCHI, M.; FERREIRA, M.B.; RIET-CORREA, F.; *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings. In: RIET-CORREA F.; PISTER J.; SCHILD A.L.; WIERENGA T. (Eds). Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins. CAB International, London. p.111-117. 2011.
- 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. 42(3). 2000.
- DePETERS, E.J.; GEORGE, L.W. Rumen transfaunation. Immunol Lett. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.009>
- Di MENNA, M.E.; BAILEY, J.R. *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. New Zealand Journal of Agriculture Research, 16, 343–351. 1973.
- DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; SEITZ A.L.; BARROS, S.S.; CRUZ, C.E.F. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. Toxicon, v.40, p.1027-1031, 2002.
- DRIEMEIER, D.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos (“foam cells”). Pesquisa Veterinária Brasileira, v.18, p. 29 - 34.1998.
- DUARTE, A.L.L.; MEDEIROS, R.M.T.; CARVALHO, F.K.L.; LEE, S.T.; COOK, D.; PFISTER, J.A.; COSTA, V.M.M.; RIET-CORREA, F. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. J. Appl. Toxicol., 34: 220–223. doi: 10.1002/jat.2860. 2013.
- EJIRI, N.; KATAYAMA, K.; DOI, K. Induction of cytochrome P450 isozymes by phenobarbital in pregnant rat and fetal livers and placenta. Experimental and molecular pathology 78: 150-155. 2005.

- EPHRAIM, E.; ODENYO, A.; ASHENAFI, M. Isolation and characterization of tannin-degrading bacteria from faecal samples of some wild ruminants in Ethiopia. *Anim Feed Sci Technol*; 118:243–53. 2005.
- FACCIN, T.C.; RIET-CORREA, F.; RODRIGUES, F.S.; SANTOS, A.C.; MELO, G.K.A.; SILVA, J.A.; FERREIRA, R.; ÍTAVO, C.C.B.F.; LEMOS, R.A.A. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. *Toxicon* 82. 1–8. 2014.
- FLAOYEN, A.; JENSEN, E.G. Microsomal enzymes in lambs and adult sheep, and their possible relationship to alveld. *Vet. Res. Commun.* 15: 271-278, 1991.
- FREELAND, W.J.; JANZEN, D.H. Strategies in herbivory by mammals: The role of plant secondary compounds. *Am. Nat.* 108: 269-289. 1974.
- FURLAN, F.H.; COLODEL, E.M.; LEMOS, R.A.A.; CASTRO, M.B.; MENDONÇA, F.S.; RIET-CORREA, F. Poisonous Plants Affecting Cattle in Central-Western Brazil. *IJPPR*, vol. 2, Fall 2012.
- GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Pharmacological basis for hepatic drug metabolism in sheep. *Vet Res.* 27(4-5): 363-72. 1996.
- GANZERA, M.; BEDIR, E.; KHAN, I.A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Sci.* 90 (11), 1752-1758. 2001.
- GIARETTA, P.R.; PANZIERA, W.; GALIZA, G.J.A.; BRUM, J.S.; BIANCHI, R.M.; HAMMERSCHMITT, M.E.; BAZZI, T.; BARROS, C.S.L. Seneciosis in cattle associated with photosensitization. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(5):427-432. 2014.
- GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; CASTELL, J.V.; DONATO, M.T. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-Biological Interactions* 168: 30–50. 2007.
- GOULD, L.S.; HOHENBOKEN, W.D. Differences between progeny of beef sires in susceptibility to Fescue Toxicosis. *J. Anim. Sci.* 71:3025-3032. 1993.
- GRACINDO, C.V.; LOUVANDINI, H.; RIET-CORREA F.; BARBOSA-FERREIRA, M.; CASTRO, M.B. Performance of sheep grazing in pastures of *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. *Trop Anim Health Prod.* 46:733–737. 2014.

- GRAYDON R.I.; HAMID H.; ZAHARI P. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. Aust. Vet. J. 68:234-236. 1991.
- GRECCO, F.B.; ESTIMA-SILVA, P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M.P.; RAFFI, M.B.; SCHILD, A.L. Intoxicação experimental aguda por *Senecio brasiliensis* em ovinos e indução de resistência à intoxicação. Pesq. Vet. Bras. 32(9):912-916. 2012.
- HASIAH, A.H.; ELSHEIKH, H.A.; ABDULLAH, A.S.; KHAIRI, H.M. AND RAJION, M.A. Effect of Phenobarbitone Treatment Against Signal Grass (*Brachiaria decumbens*) Toxicity in Sheep. The Vet. J.Vet. v.160, p. 267-272, 2000.
- HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada a Medicina Veterinária. 1ed. São Paulo: Manole. p. 367-414. 2008.
- HELLER, F. Genetics/Genomics and drug effects. Acta Clinica Belgica. 68-2. 2013.
- HOHENBOKEN, W.D.; ROBERTSON, J.L.; BLODGETT, D.J.; MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R. Sporidesmin-induced mortality and histological lesions in mouse lines divergently selected for response to toxins in endophyte-infected fescue. J. Anim. Sci. 78:2157. 2000.
- HOHENBOKEN, W.D.; BLODGETT, D.J. Growth and physiological responses to toxicosis in lines of mice selected for resistance or susceptibility to endophyte-infected tal fescue in the diet. J. Anim. Sci., 75, 2165–2173. 1997.
- HUAN, J.; MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R.; CHEEK, P.R. The Roles of CYP3A and CYP2B Isoforms in Hepatic Bioactivation and Detoxification of the Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine in Sheep and Hamsters. Toxicology and applied Pharmacology 151, 229-235. 1998.
- JONES, R.J.; MEGARRITY, R.G. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of leucaena. Aust Vet J; 63:259–62. 1986.
- KHAIRI, H. M.; ELSHEIKH, H. A.; SALAM ABDULLAH, A. The effect of signal grass (*Brachiaria decumbens*) on drug-metabolizing enzymes in sheep and comparison with normal cells. Veterinary & Human Toxicology. v.42, p.193-195, 2000.

- LAJIS, N.H.; ABDULLAH, A.S.; SALIM, S.J.; BREMNER, J.B.; KHAN, M.N. Epi-sarsapogenin and epi-smilagenins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. *Steroids*. v.58, p.387-9, 1993.
- LEMOS, R.A.A.; FERREIRA, L.C.L.; SILVA, S.M.; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v.26, p.109-113, 1996.
- LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; HERRERO Jr, G.O.; SILVEIRA, A.C.; PORFÍRIO, L.C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*, v.28 n.3 507-510. 1998.
- LEMOS, R.A.A.; SALVADOR, S.C.; NAKAZATO, L. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 39:376-377. 1997.
- LIMA, F.G.; HARAGUCHI, M., PFISTER, J.A., GUIMARAES, V.Y., ANDRADE, D.D.F., RIBEIRO, C.S., COSTA, G.L., ARAUJO, A.L.L., FIORAVANTI, M.C.S. Weather and plant age affect the levels of steroidal saponin and *Pithomyces chartarum* spores in *Brachiaria* grass. *International Journal of Poisonous Plant Research*, 2, 45–53. 2012.
- MEAGHER, L.P.; MILES, C.O.; FAGLIARI, J.J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. *Veterinary and Human Toxicology*, Manhattan, 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. *An. Feed Sci. and Tecno.*, v.91, p. 157-170, 2001.
- MILES, C.O.; MUNDAY, S.C.; HOLLAND, P.T.; SMITH, B.L.; EMBLING, P.P. Identification of a saponin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. *N. Z. Vet. J.* 39:150. 1991.
- MILES, C.O.; WILKINS, A.L.; MUNDAY, S.C.; HOLLAND, P.T.; SMITH, B.L.; LANCASTER, M.J.; EMBLING, P.P. Identification of the calcium salt of epismilagenin P-D-glucuronide in the bile crystals of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* and *Panicum schinzii* toxicoses. *J. Agnc. Food Chem.* 40:1606. 1992.
- MILES, C.O.; WILKINS, A.L.; MUNDAY, S.C.; Identification of insoluble salts of the beta-D glucuronides of episarsapogenin and epismilagenin in the bile of lambs with alveld

- and examination of *Nartheccium ossifragum*, *Tribulus terrestris* and *Panicum miliaceum* for sapogenins. J Agric Food Chem 41:914–917. 1993.
- MILLER, B.F.; ARMSTRONG, K.L.; WILSON, L.A.; HOHENBOKEN, W.D.; SAACKE, R.G. Variation Among Inbred and Line cross Mice in Response to Fescue Toxicosis. J. Anim. Sci. 72: 2896 – 2904. 1994.
- MILLER, M.S.; MCCARVER, D.G.; BELL, D.A.; EATON, D.L.; GOLDSTEIN, J.A. Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes, Fundam. Appl. Toxicol. 40. 1–14. 1997.
- MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R.; WHEELER, M.; WESSELINK, C. Selection for or against facial eczema susceptibility in Romney sheep, as monitored by serum concentrations of a liver enzyme, New Zealand Journal of Agricultural Research, 38:2, 211-219. 1994.
- MORRIS, C.A. Review of genetic parameters for disease resistance in sheep in New Zealand and Australia. Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet. 18:263-271. 2009.
- MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R.; WHEELER, M.; AMYES, N.C. A note on the genetics of resistance or susceptibility to ryegrass staggers in sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research, 38:3, 367-371. 1995.
- MORRIS, C.A.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; WEST, C.J.; WHEELER, M. Faecal nematode egg counts in lactating ewes from Romney flocks selectively bred for divergence in lamb faecal egg count. Anim. Sci. 67, 283–288. 1998.
- MORRIS, C.A.; SMITH, B.L.; HICKEY, S.M. Relationship between sporidesmin-induced liver injury and serum activity of gamma-glutamyltransferase in Romney lambs sired by facial eczema-resistant or control rams. New Zealand Veterinary Journal, Volume 50, Issue 1, pp 14-18. 2002.
- MORRIS, C.A.; TOWERS, N.R.; WESSELINK, C.; SOUTHEY, B.R. Effects of facial eczema on ewe reproduction and postnatal lamb survival in Romney sheep, New Zealand Journal of Agricultural Research, 34:4, 407-412. 1991.
- MUSTAFA, V.S.; MOSCARDINI, A.R.C.; BORGES, J.R.; RECKZIEGEL, G.C.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, M.B. Caracterização da intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. Pesq. Vet. Bras. 32(12):1272-1280. 2012.
- MUZZI, L.A.L.; MUZZI, R.A.L.; GABELLINI, E.L.A. Técnica de fistulação e canulação do rúmen em bovinos e ovinos. Ciênc. agrotec. vol.33, pp. 2059-2064. ISSN 1413-7054. 2009.

- NOORDIN, M.M.; SALAM ABDULLAH, A.; RAJION, M.A. Experimental *Brachiaria decumbens* toxicity in cattle. *Vet Res Commun* 13: 491-494, 1989.
- ODENYO, A.A.; BISHOP, R.; ASEFA JAMNADASS, G.; ODONGO, D.; OSUJI, P. Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from East African Ruminants. *Anaerobe*; 7:5–15. 2001.
- OLESZEK, W.A. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography*, 967, 147-162. 2002.
- OLIVEIRA, A.M.; COSTA, L.F.; FONSECA, C.A. Farmacogenética e farmacogenômica da biotransformação de drogas. *Revista eletrônica de farmácia*. v.3, p.39-41, 2006.
- OLIVEIRA, M.D.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, F.K.L.; SILVA, G.B.; PEREIRA, W.S.; MEDEIROS, R.M.T. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(6):731-734. 2013.
- PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(6):752-758. 2013.
- PORTO, M.R.; SATURNINO, K.C.; LIMA, E.M.M.; LEE, S.T.; LEMOS, R.A.A.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, M.B. Avaliação da exposição solar na intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 33(8):1009-1015. 2013.
- RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.S.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):183-192. 2011.
- RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M.D.C. Intoxicações por plantas tóxicas e micotoxinas, p.99-221. In: RIET-CORREA F.; SCHILD A.L.; LEMOS R.A.A.; BORGES J.R.J. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.2. 3a ed. Pallotti Editora, Santa Maria. 2007.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq. Vet. Bras.* 21(1):38-42, jan./mar. 2001.
- RISSI, D.R.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A.L.; TROST, M.E.; BRUM, J.S.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Intoxicações por plantas e micotoxinas

- associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 27(7):261-268, julho 2007.
- SALAM ABDULLAH, A.; LAJIS, N.H.; BREMNER, J.B.; DAVIES, N.W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M.A. Decumbens intoxicated sheep. Veterinary & Human Toxicology, v.34, p.154-155, 1992.
- SANTOS Jr, H.L. Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento de *Brachiaria decumbens* em ovinos. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 70p. 2008.
- SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V. e BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. Pesq.Vet. Bras., v.28, p.1-14, 2008.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Editora da UFRGS e Editora da UFSC, p 323-354. 2000.
- SANTOS, V.R.V.; LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C.M.; BRITO, D. Características estruturais e bromatológicas do capim tanzânia sob pastejo isolado, simultâneo e alternado de ovinos com bovinos. Ciência Animal Brasileira. UFG. v. 12, p. 670-680, 2011.
- SATURNINO, K.C.; MARIANI, T.M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM K.B.; FERNANDES, C.E.S.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. Pesq. Vet. Bras. 30(3):195-202. 2010.
- SMITH, D.A.; ABEL, S.M.; HYLAND, R.; JONES, B.C. Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo, Xenobiotica. 28. 1095–1128. 1998.
- STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Fundamental of Veterinary Clinical Pathology. 2nd ed. Blackwell Publishing, Iowa, p.16-17. 2008.
- TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Drug metabolism. In: GOLAN, D.E.; TASHJIAN Jr, R.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basics of Drug Therapy. 3ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. USA. 2012.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S.; BRITO, I.S.; CHAGAS, B.R.; FRANÇA, T.N.; BRUST, L.A.G. Experimentos em bovinos com favas de

Enterolobium contortisiliquum e *E. timbouva* para verificar propriedades fotossensibilizantes e/ou abortivas. *Pesq. Vet. Bras.* 19(1):39-45. 1999.

TOWERS, N.R.; STRATTON, G.C. Serum gammaglutamyltransferase as a measure of sporidesmin induced liver damage in sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 26: 109-112. 1978.

TOWERS, N.R. Mycotoxin poisoning in grazing livestock in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. Vol 66. 2006.

WOOD, S.L.; HOHENBOKEN, W.D.; KUEHN, L.A. Response to intensity of reproduction in mouse lines resistant or susceptible to fescue toxicosis. *J. Anim. Breed. Genet.* 123. 272–279. 2006.