

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**INTOXICAÇÃO POR *Brachiaria brizantha* EM REBANHOS
DE OVINOS NAIVE E EXPERIENTE**

Tatiane Cargnin Faccin

**CAMPO GRANDE, MS
2014**

2014		INTOXICAÇÃO POR <i>Brachiaria brizantha</i> EM REBANHOS DE OVINOS NAÍVE E EXPERIENTE		FACCIN
------	--	--	--	--------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**INTOXICAÇÃO POR *Brachiaria brizantha* EM REBANHOS DE
OVINOS NAÍVE E EXPERIENTE**

Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep

Tatiane Cargnin Faccin

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2014

Certificado de aprovação

TATIANE CARGNIN FACCIN

**INTOXICAÇÃO POR *Brachiaria brizantha* EM REBANHOS DE OVINOS
NAÍVE E EXPERIENTE**

Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção
do título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 07/02/2014

BANCA EXAMINADORA:

Doutor Ricardo Antônio Amaral de Lemos
(UFMS) – (Orientador)

Doutora Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo
UFMS

Doutora Larissa Gabriela Ávila
UFMS

Dedico este trabalho a minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e saúde e aos meus pais (Vicente e Irene), aos meus irmãos (Fabiane e Flávio) e ao meu namorado (Fernando) por todo apoio.

Agradeço a todos os professores pelos ensinamentos e aos amigos, colegas e técnicos pela ajuda.

Um obrigada especial ao professor Ricardo pela orientação e ao professor Franklin Riet-Correa pela imensa ajuda e atenção dispensadas na confecção do artigo.

“Ninguém jamais afundou em seu próprio suor.”

“O saber não ocupa espaço.”

Autores desconhecidos

Resumo

FACCIN, T.C. Intoxicação por *Brachiaria brizantha* em rebanhos de ovinos *naive* e experiente. 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da ingestão de protodioscina em dois diferentes rebanhos de ovinos: um rebanho de 23 ovinos cruzados nativos de Mato Grosso do Sul criados em pastagem de *Brachiaria* spp. desde o nascimento (rebanho experiente); e outro rebanho (rebanho *naive*) de 18 ovinos cruzados Dorper x Santa Inês criados no Estado do Paraná em pastagens de *Paspalum notatum* e *Lolium multiflorum*. Os dois rebanhos foram colocados juntos em uma pastagem de *Brachiaria brizantha*, durante o período de 140 dias, na estação chuvosa. No início do experimento e depois a cada 14 dias, amostras de sangue foram coletadas para determinação da atividade sérica de gama-glutamil transferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST), e para a determinação do índice ictérico. Nos mesmos dias, amostras de folhas novas, maduras e senescentes de *B. brizantha* foram coletadas para quantificação de protodioscina. Os ovinos *naive* foram mais susceptíveis à intoxicação por *B. brizantha* que os ovinos experientes. Seis ovelhas do grupo *naive* se intoxicaram e, destas, duas morreram. Duas ovelhas do rebanho experiente se intoxicaram e uma morreu. As médias das atividades séricas de GGT e AST foram significativamente maiores no rebanho *naive*, também evidenciando a maior susceptibilidade à intoxicação. Estes resultados sugerem que rebanhos de ovinos incluem animais com diferentes graus de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp. e que o descarte dos animais susceptíveis pode aumentar consideravelmente a resistência do rebanho. Os sinais clínicos e as lesões foram semelhantes aos descritos na literatura. No entanto, em ovinos com pelagem preta, o principal sinal clínico foi a perda de peso sem fotossensibilização. Uma ovelha do rebanho experiente apresentou cirrose, com sinais clínicos de intolerância ao exercício. A concentração de protodioscina (% MS) variou de 0,87% a 2,58% (média $\pm$ DP: 1,64 $\pm$ 0,58) em folhas jovens, de 1,16% a 2,53% (1,67 $\pm$ 0,44) em folhas maduras e de 0,98% a 2,07% (1,52 $\pm$ 0,37) em folhas senescentes. Uma relação negativa foi encontrada entre a concentração de saponina e a precipitação total acumulada.

Palavras-chave: *Brachiaria* spp.; protodioscina; fotossensibilização hepática; emagrecimento; cirrose hepática; intoxicação por plantas.

Abstract

FACCIN, T.C. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

The aim of this work was to study the effects of protodioscin ingestion in two different flocks of sheep: a flock of 23 crossbreed Mato Grosso do Sul Native sheep raised on *Brachiaria* spp. pastures from birth (experienced flock); and another flock (naïve flock) of 18 crossbred Dorper x Santa Inês sheep raised in the state of Paraná in *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* pastures. The two flocks grazed together in a *Brachiaria brizantha* pasture during a 140-day period in the rainy season. At the beginning of the experiment and every 14 days thereafter, blood samples were collected for determination of serum activities of gamma-glutamyl transferase (GGT) and aspartate aminotransferase (AST), and for determination of the icterus index. On the same days, samples of young, mature and old *B. brizantha* leaves were collected for protodioscin quantification. Naïve sheep were more susceptible to poisoning by *B. brizantha* than experienced sheep. Six sheep in the naïve flock were poisoned, and two of these died. Two sheep in the experienced flock were poisoned, and one of them died. The mean activities of serum GGT and AST were significantly higher in the naïve flock, also evidencing a higher susceptibility to the poison. These results suggest that flocks of sheep include animals with different degrees of resistance to *Brachiaria* spp. poisoning and that culling the susceptible animals may considerably increase of the resistance of the flock. The clinical signs and the lesions were similar to those previously reported. However, in sheep with black coats, the main clinical sign was weight loss without photosensitization-mediated dermatitis. One sheep from the experienced flock presented cirrhosis, with clinical signs of exercise intolerance. The protodioscin concentration (% DM) ranged from 0.87% to 2.58% (mean $\pm$ SD: 1.64 $\pm$ 0.58) in young leaves, 1.16% to 2.53% (1.67 $\pm$ 0.44) in mature leaves and 0.98% to 2.07% (1.52 $\pm$ 0.37) in old leaves. A negative relationship was found between saponin concentration and total cumulative precipitation.

Keywords: *Brachiaria* spp.; protodioscin; hepatic photosensitization; weight loss; liver cirrhosis; poisonous plants.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Concentrações de protodioscina que causaram intoxicação em ruminantes no Brasil.....	5
Tabela 2 – Morbidade, mortalidade e letalidade da intoxicação por <i>Brachiaria</i> spp. em ovinos no Brasil.....	7

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Histórico e etiologia.....	3
2.2 Epidemiologia.....	5
2.3 Patogenia.....	7
2.4 Patologia clínica.....	8
2.5 Sinais clínicos.....	9
2.6 Patologia.....	11
2.7 Diagnóstico.....	11
2.8 Tratamento, controle e profilaxia.....	12
3. REFERÊNCIAS.....	13
4. CAPÍTULO 1 - Poisoning by <i>Brachiaria brizantha</i> in flocks of naïve and experienced sheep.....	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43

1. INTRODUÇÃO

As gramíneas do gênero *Brachiaria* são as forrageiras mais importantes para alimentação de ruminantes nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte do Brasil devido a alta produção de matéria seca, fácil cultivo, resistência à seca, boa adaptação a diferentes solos, baixo custo de manutenção e crescimento durante a maior parte do ano (SEIFFERT, 1980; SALLAM ABDULLAH; RAJION, 1997; CASTRO et al., 2011). Existem diversas espécies de *Brachiaria*, e as mais cultivadas atualmente são *Brachiaria brizantha*, seguida por *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* (RIET-CORREA et al., 2011).

Apesar de sua importância como forrageira no Brasil, as gramíneas deste gênero podem causar fotossensibilização hepatógena em bovinos (NOBRE; ANDRADE, 1976; LEMOS et al., 1996a, 1996c, 1997; SOUZA et al., 2010), ovinos (LEMOS et al., 1996b; CRUZ et al., 2000; DRIEMEIER et al., 2002; SILVA et al., 2006; BRUM et al., 2007; MACÊDO et al., 2008; MENDONÇA et al., 2008; SANTOS JR, 2008; GRACINDO, 2009; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; CASTRO et al., 2011; RISSI et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012), caprinos (LEMOS et al., 1998; MACÊDO et al., 2008; SILVEIRA et al., 2009), bubalinos (OLIVEIRA et al., 2013) e equinos (BARBOSA et al., 2006) e também quadros de emagrecimento sem dermatite em bovinos (RIET-CORREA et al., 2002; SOUZA et al., 2010) e ovinos (SANTOS JR, 2008; PORTO et al., 2013). Os animais jovens são considerados mais susceptíveis do que adultos (BRUM et al., 2007; ALBERNAZ et al., 2010), e os ovinos são mais sensíveis que os bovinos (RIET-CORREA et al., 2011). A protodioscina, que é uma saponina esteroidal, tem sido implicada como a causa da doença (BRUM et al., 2007).

Foi demonstrado que existem diferenças na resistência / susceptibilidade de ovinos à intoxicação por *Brachiaria*. Em estudo realizado em pastagens de *B. decumbens*, foi demonstrado que cordeiros de quatro a seis meses de idade criados em outras pastagens e introduzidos em *B. decumbens* são mais susceptíveis à intoxicação do que cordeiros da mesma idade, filhos de ovelhas que pastejavam nesta forrageira por mais de três anos (CASTRO et al., 2011).

Devido à importância de *Brachiaria* spp. na maioria das regiões brasileiras, é necessário implementar medidas preventivas e de controle para a sua toxicidade. Foram propostas duas medidas principais para a utilização segura de *Brachiaria* spp. em pastagens: o uso de espécies ou cultivares menos tóxicas do gênero *Brachiaria* e o uso de animais resistentes (RIET-CORREA et al., 2011.). A utilização de *B. brizantha* é uma alternativa,

porque esta espécie é considerada menos tóxica (GRACINDO, 2009; RIET-CORREA et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012) que *B. decumbens*. No entanto, surtos de intoxicação por *B. brizantha* foram relatados em bovinos (LEMOS et al., 1996a; SOUZA et al., 2010), ovinos (MACÊDO et al., 2008; ALBERNAZ et al., 2010; RISSI et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012) e caprinos (SILVEIRA et al., 2009).

Nesse contexto, objetivou-se verificar os efeitos da ingestão de uma pastagem de *B. brizantha* em dois rebanhos distintos de ovinos, um criado em pastagem de *Brachiaria* spp. (rebanho experiente) e outro criado em pastagens de *Paspalum notatum* e *Lolium multiflorum* (rebanho *naive*). Outro objetivo foi determinar a concentração de protodioscina em folhas novas, maduras e senescentes desta planta e estabelecer sua relação com a ocorrência da intoxicação. Os resultados estão apresentados na forma de artigo intitulado “Intoxicação por *Brachiaria brizantha* em rebanhos de ovinos *naive* e experiente”, redigido de acordo com as normas da revista *Toxicon*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E ETIOLOGIA

Existem diversas espécies do gênero *Brachiaria* sendo utilizadas como forrageiras (RIET-CORREA et al., 2011). *B. decumbens* cv. IPEAN foi introduzida no Brasil em 1952 e se expandiu lentamente. *B. decumbens* cv. Basilisk, de origem australiana, foi introduzida no país em 1972 e, devido à sua reprodução por sementes, se espalhou rapidamente pelas regiões Centro-Oeste, Norte e Sul do Brasil (SEIFFERT, 1980). Atualmente, existem vários cultivares de *B. decumbens* no Brasil. *B. brizantha* tem substituído gradualmente *B. decumbens* desde que foi introduzida no país em 1980 e a principal razão para esta substituição é que *B. brizantha* apresentou-se resistente às cigarrinhas (insetos da ordem Homoptera, família Cercopidae, gêneros *Zulia*, *Mahanarva* e *Deois*), que podem causar danos severos para as pastagens de *B. decumbens* (RIET-CORREA et al., 2011). *B. humidicola* é nativa da África, ocorre em áreas relativamente úmidas e também desempenhou papel relevante na região Norte (Amazônia), a partir de 1973, onde tem substituído *B. decumbens*, devido à sua tolerância ao ataque de cigarrinhas (SEIFFERT, 1980).

No Brasil, os primeiros relatos de fotossensibilização ocorreram em 1975, e não foram relacionados a nenhum agente etiológico. Em 1976, Amaral et al. (1976) constataram intensa esporulação do fungo *Pithomyces chartarum* em folhas de *B. decumbens* e conseguiram isolar o fungo em cultura pura. Estes autores chamaram a atenção para a importância desse fungo como produtor de uma substância tóxica (esporidesmina) que induzia o “eczema facial” em ruminantes e equinos. Em seguida, vários autores comunicaram a ocorrência de fotossensibilização em ruminantes em pastagem de *B. decumbens* relacionada à presença deste fungo (SCHENK; SCHENK, 1983; TOKARNIA et al., 2012). Nobre e Andrade (1976) sugeriram que a associação da micotoxina esporidesmina produzida pelo fungo com a fotossensibilização observada em bovinos deveria ser investigada porque estes autores observaram a presença do fungo *P. chartarum* em pastagens de *B. decumbens* nas quais a fotossensibilização foi observada e também onde não ocorreram casos da doença.

Em dois surtos de fotossensibilização em pastagem de *B. decumbens*, que ocorreram em 1983 e 1990, foram encontrados agregados de fendas aciculares e cristais em canalículos biliares, ductos biliares, células de Kupffer, hepatócitos e túbulos renais de ovinos. Estas estruturas cristalinas eram similares às observadas na fotossensibilização hepatógena causada por *Tribulus terrestris* e *Panicum* spp. e, nestas plantas, a produção de cristais havia sido associada à presença de saponinas (GRAYDON et al., 1991). Salam Abdullah et al. (1992)

também sugeriram que saponinas esteroidais pudessem estar envolvidas na produção dos efeitos tóxicos de *B. decumbens* em ovinos, após isolarem uma mistura de sapogeninas do conteúdo ruminal de animais intoxicados por esta gramínea.

A partir da discussão anterior, constatou-se que provavelmente a fotossensibilização por *B. decumbens* fosse parte de um grupo de doenças fotossensibilizantes associadas à ingestão de saponinas esteroidais e acompanhadas por deposição de material de cristalóide característico derivado destas saponinas em ductos biliares. Seria improvável que *P. chartarum* estivesse envolvido na etiologia da doença, porque a produção de esporidesmina por cepas americanas deste fungo ainda não havia sido descrita (SMITH; MILES, 1993).

As amostras de *Brachiaria* spp. do Brasil que causaram fotossensibilização em bovinos invariavelmente continham baixa contagem de *P. chartarum* e a grande maioria dos isolados destas amostras não produziam esporidesmina. Este fato reforçava que era improvável que intoxicação por esporidesmina fosse a causa desta fotossensibilização (MEAGHER et al., 1996; COLLIN et al., 1998). A detecção das saponinas diosgenina e iamogenina nestas amostras demonstrou que as saponinas eram claramente responsáveis pela formação de cristais biliares (MEAGHER et al., 1996).

Cruz et al. (2001) induziram colangiohepatopatia na presença de cristais em cordeiros após administração oral de extratos de *B. decumbens*. Estes estudos confirmaram que esta forrageira pode causar lesões hepáticas sem o envolvimento da esporidesmina do fungo *P. chartarum* e que as lesões histológicas observadas eram semelhantes às produzidas por saponinas esteroidais contidas em plantas como *T. terrestris* e *Panicum* spp.

A protodioscina, que é uma saponina esteroideal, tem sido responsabilizada como a causa desta doença (BRUM et al., 2007) e é a principal saponina encontrada em pastagens tóxicas de *Brachiaria* spp. para ovinos no Brasil (BRUM et al., 2007; SANTOS JR, 2008; GRACINDO, 2009; ALBERNAZ et al., 2010; CASTRO et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012; PORTO et al., 2013). As concentrações de protodioscina encontradas em espécies de *Brachiaria* que causaram intoxicação em ruminantes no Brasil estão dispostas na Tabela 1. *B. decumbens* é considerada mais tóxica (GRACINDO, 2009; RIET-CORREA et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012) e exibe maiores quantidades de protodioscina em relação a *B. brizantha* (BARBOSA-FERREIRA et al., 2011; LIMA et al., 2012).

Tabela 1. Concentrações de protodioscina que causaram intoxicação em ruminantes no Brasil

Ref.	Espécie animal	Espécie de <i>Brachiaria</i>	Tipo	Protodioscina (%)
Oliveira et al. (2013)	Búfalo	<i>B. decumbens</i>	N	3,24 a 3,54
Porto et al. (2013)	Ovino	<i>B. decumbens</i>	E	0,94±0,80
Mustafa et al. (2012)	Ovino	<i>B. decumbens</i>	N	0,3 a 2,56
Castro et al. (2011)	Ovino	<i>B. decumbens</i>	E	0,52 a 1,06
Albernaz et al. (2010)	Ovino	<i>B. brizantha</i>	N	0,88 e 0,92
Albernaz et al. (2010)	Ovino	<i>B. brizantha</i>	E	1,13 a 1,62
Silveira et al. (2009)	Caprino	<i>B. brizantha</i>	N	1,54
Gracindo (2009)	Ovino	<i>B. decumbens</i>	E	0,33 a 1,22
Santos Jr (2008)	Ovino	<i>B. decumbens</i>	E	0,77 a 2,37
Brum et al. (2007)	Ovino	<i>B. decumbens</i>	N	2,36

N = intoxicação natural, E = intoxicação experimental.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Embora a intoxicação natural possa ocorrer em todas as épocas do ano, em estudo de 35 surtos, os casos ocorreram com maior frequência de junho a outubro (MUSTAFA et al., 2012). Experimentalmente, a pastagem em brotação apresentou maiores concentrações de protodioscina, coincidindo com sinais clínicos mais severos nos ovinos e maiores taxas de morbidade, mas deve-se ressaltar que a planta pode ser tóxica em qualquer fase de crescimento vegetativo (SANTOS JR, 2008), inclusive com massa residual reduzida e folhas senescentes (ALBERNAZ et al., 2010).

A maioria dos surtos são descritos em pastagem de *B. decumbens* (LEMOS et al., 1996b; SILVA et al., 2006; BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008; MUSTAFA et al., 2012), porém também há relatos de intoxicação em *B. brizantha* (MACÊDO et al., 2008; ALBERNAZ et al., 2010; RISSI et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012). A intoxicação em outras espécies do gênero *Brachiaria* é rara, com descrição de surtos isolados em *B. humidicola* e *Brachiaria ruziziensis* (RIET-CORREA et al., 2011).

Um fator importante relacionado à intoxicação é a idade, sendo os cordeiros mais susceptíveis que animais adultos (BRUM et al., 2007; ALBERNAZ et al., 2010). Na região Centro-Oeste, aproximadamente 90% dos surtos foram relatados em ovinos com menos de um ano de idade (MUSTAFA et al., 2012).

Outro fator importante é que a intoxicação natural é mais reportada em ovinos *naive*, ou seja, que nunca ingeriram pastagens do gênero *Brachiaria* previamente. Na maioria dos surtos relatados no Brasil, os ovinos estavam há pouco tempo em pastagem de *Brachiaria* (10 a 50 dias), quando começaram a aparecer sinais clínicos (LEMOS et al., 1996b; SILVA et al., 2006; BRUM et al., 2007; MACÊDO et al., 2008; MENDONÇA et al., 2008). Estes animais

normalmente são recém-adquiridos de outras localidades, principalmente da região Nordeste, onde pastagens do gênero *Brachiaria* são menos frequentes (MUSTAFA et al., 2012).

A intoxicação é rara em ovinos criados em *Brachiaria* spp. desde o nascimento até a fase adulta e ocorre na forma de casos isolados (MUSTAFA et al., 2012).

Outro fator importante para intoxicação é a susceptibilidade individual dos animais (SATURNINO et al., 2010). Os ovinos podem ser divididos em três grupos em relação à susceptibilidade à intoxicação por esta gramínea. O grupo sensível é constituído de animais que apresentam sinais clínicos de intoxicação, assim como aumento da atividade sérica de gama-glutamyltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST). Dentro deste grupo, há diferentes níveis de sensibilidade. Alguns animais intensamente sensíveis morrem, mesmo quando são retirados da pastagem logo após o surgimento dos sinais clínicos. Entretanto, outros ovinos podem se recuperar da intoxicação, retornar à pastagem de *Brachiaria* spp. com presença ou ausência de recidivas. O segundo grupo é de animais resistentes que não apresentam sinais clínicos e nem aumento das atividades séricas de GGT e AST. E o terceiro grupo, denominado resiliente, apresenta forma subclínica da intoxicação com ausência de sinais clínicos e aumento das atividades séricas de GGT e AST (RIET-CORREA et al., 2011).

Embora não existam estudos ou experimentos conduzidos com o objetivo de avaliar a influência da nutrição na ocorrência de casos clínicos, é provável que a mesma exerça efeito na intoxicação. Em experimento conduzido com dois grupos de cordeiros mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp., no qual um grupo era mantido em *creep feeding* e o outro não recebia suplementação, observou-se maior ocorrência de casos (38,9%) no grupo não suplementado. Comparativamente, no grupo *creep feeding* a morbidade foi de 10,5%. (MELO, 2014). A maior susceptibilidade do grupo de cordeiros sem suplementação pode estar relacionada à ingestão exclusiva de pastagem, ao maior período de exposição à planta, pois o grupo controle precisou de maior tempo para atingir o peso de abate e também ao maior período de permanência do alimento no trato digestivo. Estes fatores levam este grupo a maior exposição ao princípio tóxico da gramínea, tornando-o mais susceptível. A mudança da flora ruminal pode influenciar a ocorrência da intoxicação nos animais suplementados, pois o metabolismo das saponinas ocorre no rúmen.

As taxas de morbidade, mortalidade e letalidade da intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Morbidade, mortalidade e letalidade da intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil

Ref.	Tipo	Nº de animais	Morbidade (%)	Mortalidade (%)	Letalidade (%)
Porto et al. (2013)	E	18	22,2	16,6	75
Mustafa et al. (2012)	N	1305	23,2	20	86,5
Castro et al. (2011)	E	20	50	15	30
Albernaz et al. (2010)	N	193	32,12	25,9	80,6
Albernaz et al. (2010)	E	49	69,4	63,2	91,1
Saturnino et al. (2010)	E	24	45,8	45,8	100
Mendonça et al. (2008)	N	40	37,5	17,5	46,7
Santos Jr (2008)	E	21	57,1	42,8	75
Brum et al. (2007)	N	28	25	21,4	85,7
Silva et al. (2006)	N	200	25	25	100
Lemos et al. (1996b)	N	163	31,3	18,4	58,8

N = intoxicação natural; E = intoxicação experimental. * Atualizado de Mustafa et al. (2012).

2.3 PATOGENIA

As saponinas diosgenina e iamosgenina foram detectadas em pastagens de *B. decumbens* que causaram fotossensibilização hepatógena (MEAGHER et al., 1996). No rúmen de ovinos intoxicados por esta forrageira, foram detectadas epismilagenina e episarsasapogenina (LAJIS et al., 1993; CRUZ et al., 2000) e misturas de smilagenina e sarsasapogenina (CRUZ et al., 2000) e de sapogeninas identificadas como 3-spirostenols (SALAM ABDULLAH et al., 1992). Na bile, a análise demonstrou epismilagenina e episarsasapogenina (CRUZ et al., 2000).

Provavelmente, os cristais biliares são formados por metabolismo ruminal envolvendo hidrólise de açúcares de saponinas seguida por redução de 5-6 ligação dupla, epimerização de 3-β-OH para 3-α-OH (possivelmente via 3-ketosmilagenina) e, finalmente, conjugação com ácido glucurônico. Os glucuronídeos, em seguida, formam um sal insolúvel com Ca²⁺ formando os depósitos cristalinos característicos (MILES et al., 1991).

A dose de um extrato de saponina para cordeiros revelou que o rúmen é uma região onde as saponinas diosgenina-derivadas ingeridas são hidrolizadas, reduzidas e convertidas em tigogenina, smilagenina, smilagenone e epismilagenina. A ausência da saponina diosgenina-derivada uma hora depois da dosagem indica a rápida hidrólise da saponina pela microflora ruminal. O duodeno, jejuno e íleo formam uma zona de absorção e secreção onde há variação nas concentrações de sapogeninas livres e conjugadas. Acredita-se que as sapogeninas sejam absorvidas na região do duodeno e transportadas para o fígado via veia portal, e desta forma as sapogeninas livres podem submeter-se à conjugação em glucuronídeos no fígado. Os cristais biliares são predominantemente sais de cálcio de

epismilagenina e episarsasapogenina. Epismilagenina foi a sapogenina conjugada dominante detectada nas amostras de bile. Finalmente, há uma região de concentração de sapogeninas e epimerização no ceco e cólon, com a remoção da água e contínuo metabolismo de sapogeninas (MEAGHER et al., 2001).

A degeneração hidrópica hepatocelular difusa e a hiperplasia do retículo endoplasmático liso observadas em ovinos em pastagem de *B. decumbens* (DRIEMEIER et al., 2002) indicam injúria colestática específica e prolongada (KELLY, 1993). Quando estes achados são considerados juntamente com a presença de cristais dentro de hepatócitos, isto sugere que o efeito citohepatotóxico inicial causa subsequente colangiohepatopatia que, de acordo com o grau de severidade desenvolvido poderia levar a fotossensibilização (DRIEMEIER et al., 2002).

A presença de macrófagos espumosos no fígado e em linfonodos hepáticos e mesentéricos, e sua ausência em outros linfonodos fora do trato digestivo, sugere que as substâncias acumuladas nestas células são provavelmente absorvidas pelo intestino ou pelo ciclo enterohepático da bile (DRIEMEIER et al., 2002).

A fotossensibilização secundária ou hepatógena ocorre em herbívoros quando há comprometimento da capacidade do fígado em excretar a filoteritina, formada no trato digestivo pela degradação da clorofila e excretada na bile. Quando há dano hepatocelular primário ou obstrução biliar, a filoteritina não é eliminada e se acumula nos tecidos. Em áreas de pele despigmentadas e expostas à luz solar, essa substância fotodinâmica reage com a luz ultravioleta causando dermatite, com dano vascular e epidérmico, condição conhecida como fotossensibilização secundária ou hepatógena. Como a excreção de filoteritina segue os mesmos passos da eliminação dos pigmentos biliares, é comum, porém não obrigatório, observar-se icterícia associada à fotossensibilização secundária. A elevação das concentrações séricas de bilirrubina e/ou ácidos biliares é observada na fotossensibilização hepatógena (HARGIS; GINN, 2012).

2.4 PATOLOGIA CLÍNICA

O aumento das atividades séricas de GGT e AST (BRUM et al., 2007; SANTOS JR, 2008; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; CASTRO et al., 2011; PORTO et al., 2013), e o aumento das concentrações séricas de bilirrubina total, direta e indireta (BRUM et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008; ALBERNAZ et al., 2010) tem sido detectados na intoxicação natural e experimental por *Brachiaria* spp. em ovinos. Há também relatos de

aumento da concentração sérica de ureia e creatinina em ovinos intoxicados por esta gramínea (ALBERNAZ et al., 2010).

O aumento na atividade sérica de GGT é observado em casos de colestase ou hiperplasia biliar, porque esta enzima é originária das membranas dos canalículos e ductos biliares. Concentrações elevadas de ácidos biliares no fígado e no plasma são esperadas na ocorrência de colestase. O aumento da concentração dos ácidos biliares ou de outros constituintes da bile estimula a síntese e liberação de GGT. Distúrbios que causam colestase podem também induzir hiperplasia biliar e aumento resultante na atividade de GGT (STOCKHAM; SCOTT, 2011). A atividade sérica de GGT é utilizada como critério diagnóstico de doenças hepatobiliares em ovinos (RADOSTITS et al., 2007).

O aumento da atividade sérica de AST está relacionado à lesão do hepatócito (reversível ou irreversível) que pode ocorrer em razão de uma variedade de agressões. A AST também pode ser liberada dos hepatócitos durante os estágios de regeneração de doença hepática e sua concentração pode estar aumentada nos casos de lesão muscular (STOCKHAM; SCOTT, 2011), não sendo considerada específica para o diagnóstico de hepatopatias (RADOSTITS et al., 2007).

A hiperbilirrubinemia ocorre quando a taxa de produção de bilirrubina não conjugada (Bnc) excede a de captação de Bnc pelos hepatócitos, ou a taxa de formação de bilirrubina conjugada (Bc) nos hepatócitos ultrapassa a excreção de Bc na bile. Na intoxicação por *Brachiaria*, há diminuição da excreção da Bc devido à colestase obstrutiva que é causada por obstrução do fluxo biliar através dos canalículos ou ductos biliares (STOCKHAM; SCOTT, 2011). As lesões que prejudicam o fluxo biliar incluem tumefação hepatocelular que comprime os canalículos, lesões periportais que comprimem os ductos biliares e a obstrução dos ductos biliares por cristais.

Há também diminuição da captação de Bnc pelos hepatócitos e diminuição da conjugação de Bnc devido à diminuição da massa funcional hepática. A redução acentuada nos hepatócitos funcionais pode resultar em menor captação de Bnc pelos hepatócitos, diminuição da conjugação de Bnc e diminuição da excreção de Bc (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

O tempo entre a permanência dos ovinos no pasto e o surgimento dos sinais clínicos de intoxicação por *Brachiaria* spp. é geralmente de 15 a 60 dias (SALAM ABDULLAH et al., 1988, 1989; GRAYDON et al., 1991; BRUM et al., 2007; MACÊDO et al., 2008;

GRACINDO, 2009; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; CASTRO et al., 2011; PORTO et al., 2013), porém alguns relatos descreveram a ocorrência de sinais em ovinos *naive* (sem contato prévio com a gramínea) a partir de 7 dias de pastejo (SANTOS JR, 2008; ALBERNAZ et al., 2010; PORTO et al., 2013). Em estudos com séries históricas, este período é extremamente variável, com intervalos de 15 dias a mais de 12 meses (MUSTAFA et al., 2012).

O quadro característico desta intoxicação é de fotossensibilização com icterícia (OPASINA, 1985; SALAM ABDULLAH et al., 1988, 1989; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b; CRUZ et al., 2000; KHAIRI et al., 2000; DRIEMEIER et al., 2002; HAISAH et al., 2003; SILVA et al., 2006; MACÊDO et al., 2008; MENDONÇA et al., 2008; SANTOS JR, 2008; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; RISSI et al., 2011; MUSTAFA et al., 2012). As lesões características de fotodermatite incluem edema de face, pálpebras, orelhas, vulva, base da cauda e prepúcio, espessamento da pele com perda de elasticidade, úlceras, exsudação, alopecia e formação de crostas na face e no corpo. Alguns animais podem apresentar as orelhas com as bordas voltadas para cima devido à retração cicatricial (LEMOS et al., 1996b). Outros sinais observados nesta forma de apresentação da doença incluem prurido, inquietação, fotofobia, anorexia, apatia, depressão, desidratação, secreção nasal e ocular, cegueira, conjuntivite e opacidade bilateral da córnea.

Alguns autores mencionam que, em quadros mais agudos, a intoxicação pode ocorrer com ausência de icterícia e dermatite (SANTOS JR, 2008; MUSTAFA et al., 2012). Os animais apresentam severo edema na face e nas orelhas (MUSTAFA et al., 2012), assim como apatia, anorexia, emagrecimento, hiperemia de mucosa e secreção ocular (SANTOS JR, 2008).

A ausência de lesões de fotossensibilização em ovinos de pelagem escura tem sido reportada (GRAYDON et al., 1991; SANTOS JR, 2008; SATURNINO et al., 2010). Estes autores relataram a ausência de lesões de fotodermatite em ovinos de pelagem preta e sua presença em ovinos com pele despigmentada mantidos sob as mesmas condições. Nos ovinos de pele pigmentada, o emagrecimento é o único sinal de intoxicação que pode ser observado (SANTOS JR, 2008).

Sinais clínicos nervosos, como incoordenação, tremor da cabeça, letargia, ataxia, depressão, pressão da cabeça contra objetos e movimentos em círculos, podem ser observados (SALAM ABDULLAH et al., 1989; ALBERNAZ et al., 2010). As disfunções neurológicas e o *status spongiosus* (degeneração esponjosa) observados em ovinos intoxicados por *Brachiaria* estão provavelmente relacionados ao severo dano hepático. O acúmulo de fluido

no interior da lamela da bainha de mielina ou a tumefação dos astrócitos pode também contribuir para o *status spongiosus* no cérebro (SALAM ABDULLAH et al., 1989). As perturbações neurológicas associadas ao *status spongiosus* do encéfalo e medula espinhal estão associadas à encefalopatia hepática (síndrome hepatocerebral). A patogenia dessas lesões é multifatorial e envolve o acúmulo de diversas substâncias tóxicas na corrente sanguínea, sendo a amônia considerada como a substância mais importante na patogênese desta doença (ILHA et al., 2001).

2.6 PATOLOGIA

Os achados de necropsia são dermatite e icterícia associadas com hepatomegalia, fígado firme, pálido, amarelado ou acastanhado com evidênciação do padrão lobular e vesícula biliar distendida. Outros achados incluem manchas esbranquiçadas multifocais por todo o parênquima hepático, opacidade de córnea, ascite, hidrotórax, hidropericárdio, atrofia gelatinosa do tecido adiposo e emaciação. Os rins podem estar marrom amarelados (OPASINA, 1985; SALAM ABDULLAH et al., 1988, 1989; GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b; CRUZ et al., 2000; KHAIRI et al., 2000; CRUZ et al., 2001; DRIEMEIER et al., 2002; BRUM et al., 2007; MACÊDO et al., 2008; MENDONÇA et al., 2008; SANTOS JR, 2008; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; MUSTAFA et al., 2012).

Histologicamente, há a presença de cristais birrefringentes ou imagens negativas destes cristais em ductos biliares, macrófagos e hepatócitos, e a ocorrência de macrófagos com citoplasma espumoso e núcleo periférico nos sinusoides levando à desorganização dos cordões de hepatócitos. Outros achados incluem tumefação e vacuolização de hepatócitos, edema ou necrose individual de hepatócitos, colestase, proliferação de ductos biliares, infiltrado inflamatório mononuclear periportal, infiltrado neutrofílico focal, pericolangite, células gigantes e, em casos crônicos, grau variável de fibrose periportal (GRAYDON et al., 1991; LEMOS et al., 1996b; CRUZ et al., 2000, 2001; DRIEMEIER et al., 2002; BRUM et al., 2007; MACÊDO et al., 2008; SANTOS JR, 2008; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; MUSTAFA et al., 2012; COSTA, et al. 2013).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico deve ser realizado com base na epidemiologia, nos sinais clínicos, achados de necropsia e confirmado pelas alterações histopatológicas (RIET-CORREA et al., 2011). Os sinais clínicos e achados de necropsia são semelhantes aos de outras plantas que

causam fotossensibilização hepatógena no Brasil, como *Panicum dichotomiflorum* (RIET-CORREA et al., 2009) e *Senecio brasiliensis* (ILHA et al., 2001; GRECCO et al., 2011). Histologicamente, o infiltrado de macrófagos espumosos nos sinusoides causando desorganização dos cordões de hepatócitos é característico da intoxicação com ou sem a presença de cristais birrefringentes ou imagens negativas destes cristais em ductos biliares, macrófagos ou hepatócitos.

2.8 TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA

Não existe tratamento para a intoxicação e o conhecimento sobre medidas de controle e profilaxia é restrito. Uma medida de controle utilizada é a retirada dos animais da pastagem de *Brachiaria* spp. (NOBRE; ANDRADE, 1976; SCHENK; SCHENK, 1983) e sempre que possível colocá-los em área com sombreamento (SCHENK; SCHENK, 1983), o que ajuda na melhora clínica dos animais. Mesmo adotando estas medidas, os animais mais sensíveis podem morrer. Riet-Correa et al. (2011) relataram que estudos devem ser conduzidos para determinar se a resistência à intoxicação é genética ou adquirida. Com este conhecimento, programas de seleção de animais resistentes poderão ser desenvolvidos, se a resistência for hereditária, ou métodos de adaptação dos animais ao consumo de *Brachiaria* spp., se for adquirida.

3. 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**, v. 30, n. 9, p. 741-748, 2010.
- AMARAL, R. E.; NAZÁRIO, W.; ANDRADE, S. O. Ocorrência do fungo *Pithomyces chartarum* em grãos e forrageiras no Brasil. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 1976, Campinas. **Resumos...** Brasília, 1976. p. 82.
- BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Graminae) no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 147-153, 2006.
- BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K. B.; OLIVEIRA, N. M. R.; VALLE, C. B.; FERREIRA, V. B. N.; GARCEZ, V. S.; RIET-CORREA, F.; LEMOS, R. A. A. Concentração da saponina esteroideal protodioscina em diferentes espécies e cultivares de *Brachiaria* spp. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, supl. 3, p. 98-113, 2011.
- 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, n. 1, p. 39-42, 2007.
- 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.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; WIERENGA, T. L. (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins**. Wallingford: CAB International, 2011. p.110-117.
- COLLIN, R. G.; ODRIOZOLA, E.; TOWERS, N. R. Sporidesmin production by *Pithomyces chartarum* isolates from Australia, Brazil, New Zealand and Uruguay. **Mycological Research**, v. 102, n. 2, p. 163-166, 1998.
- COSTA, S. Z. R.; NESPOLI, P. B.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; NOGUEIRA, V. A.; DRIEMEIER, D.; BOABAID, F. M.; PEIXOTO, P. V.; ARMIÉN, A. M.; FRANÇA, T. N. Avaliação lectino-histoquímica de fígado e rim de ovinos com fotossensibilização causada por *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 955-962, 2013.
- CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V. S.; COLODEL, E. M.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 142-145, 2000.
- CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; PIRES, V. S.; SCHENKEL, E. P. Experimentally induced cholangiohepatopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 170- 172, 2001.

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.

GRACINDO, C. V. **Avaliação do desempenho e da toxicidade em ovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum* var Aires, *Andropogon gayanus* var Planaltina**. 2009. 90 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

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

GRECCO, F. B.; ESTIMA-SILVA, P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M. P.; COLLARES, G.; SCHILD, A. L. Seneciose crônica em ovinos no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 326-330, 2011.

HAISAH, A. H.; ELSHEIKH, H. A.; KHAIRI, H. M.; SALAM ABDULLAH, A.; RAJION, M. A. Effect of griseofulvin on the toxicity of signal grass (*Brachiaria decumbens*) in sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 68-71, 2003.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. The integument (photosensitization). In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Eds), **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 1015.

ILHA, M. R. S.; LORETTI, A. P.; BARROS, S. S.; BARROS, C. S. L. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 123-138, 2001.

KELLY, W. R. The liver and biliary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Eds), **Pathology of Domestic Animals**. 4. ed. Orlando: Academic Press, 1993. p. 319-406.

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 and Human Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 193-195, 2000.

LAJIS, N. H.; ABDULLAH, S. H.; SALIM, S. J. S.; BREMNER, J. B.; KHAN, M. N. Epi-sarsasapogenin and epi-smilagenin: two sapogenins isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. **Steroids**, v. 58, p. 387-389, 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, n. 1, p. 109-113, 1996b.

LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; HERRERO JUNIOR, G. O.; SILVEIRA, A. C.; PORFIRIO, L. C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 507-510, 1998.

LEMOS, R. A. A.; OLIVEIRA, V. A.; HERRERO JÚNIOR, G. O.; FERREIRA, M. B.; ALMEIDA, A. J. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bovinos lactentes associada à ingestão de *Brachiaria decumbens*. In: XV PANVET, 1996, Campo Grande. **Resumos...** 1996c. p. 170.

LEMOS, R. A. A.; OSÓRIO, A. L. A. R.; RANGEL, J. M. R.; HERRERO JÚNIOR, G. O. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo *Brachiaria brizantha*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, p. 22, 1996a.

LEMOS, R. A. A.; SALVADOR, S. C.; NAKAZATO, L. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 6, p. 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**, v. 2, n. 1, p. 45-53, 2012.

MACÊDO, J. T. S. A.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D. Doenças da pele em caprinos e ovinos no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 633-642, 2008.

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

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

MELO, G. K. A. **Produção de cordeiros em diferentes sistemas de cria**. 2014. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014. (Dados não publicados).

MENDONÇA, F. S.; CAMARGO, L. M.; FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; BARATELLA- EVÊNCIO, L.; EVÊNCIO NETO, J. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Graminae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1034-1041, 2008.

MILES, C. O.; MUNDAY, S. C.; HOLLAND, P. T.; SMITH, B. L.; EMBLING, P. P.; WILKINS, A. L. Identification of a sapogenin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 39, n. 4, p. 150-152, 1991.

MUSTAFA, V. S.; MOSCARDINI, A. R. C.; BORGES, J. R. J.; RECKZIEGEL, G. C.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, M. B. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1272-1280, 2012.

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

OLIVEIRA, C. H. S.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; BASTIANETTO, E.; MELO, M. M.; HARAGUCHI, M.; FREITAS, L. G. L.; SILVA, M. X.; LEITE, R.C. Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. **Toxicon**, v. 73, p. 121-129, 2013.

OPASINA, B. A. Photosensitization jaundice syndrome in West African dwarf sheep and goats grazed on *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, v. 19, n. 3, p. 120-123, 1985.

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 *Bracharia decumbens* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1009-1015, 2013.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156 p.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 183-192, 2011.

RIET-CORREA, F.; HARAGUCHI, M.; DANTAS, A. F. M.; BURAKOVAS, R. G.; YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; MEDEIROS, R. M. T.; MATOS, P. F. Sheep poisoning by *Panicum dichotomiflorum* in northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 94-98, 2009.

RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; DRIEMEIER, D. Wasting and death in cattle associated with chronic grazing of *Brachiaria decumbens*. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 179-180, 2002.

RISSI, D.R.; SANT'ANA, F. J. F.; PIEREZAN, F.; ANJOS, B. L.; BARROS, C. S. L. Poisonous plants affecting sheep in Southern Brazil. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; WIERENGA, T. L. (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins**. Wallingford: CAB International, 2011. p.73-78.

SALAM ABDULLAH, A.; LAJIS, N. H.; BREMNER, J. B.; DAVIES, N. W.; MUSTAPHA, W.; RAJION, M. A. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 154-155, 1992.

SALAM ABDULLAH, A.; NOORDIN, M. M.; RAJION, M. A. Neurological disorders in sheep during signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 128-129, 1989.

SALAM ABDULLAH, A.; NOORDIN, M. M.; RAJION, M. A. Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in sheep: Changes in motility and pH of reticulo-rumen. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 256-258, 1988.

SALAM ABDULLAH, A.; RAJION, M. A. Dietary factors affecting entero-hepatic function of ruminants in the tropics. **Animal Feed Science Technology**, v. 69, p. 79-90, 1997.

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

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 195-202, 2010.

SCHENK, M. A. M.; SCHENK, J. A. P. Fotossensibilização hepatógena em bovinos: aspectos gerais. **Comunicado Técnico, Embrapa - CNPGC**, n. 19, p. 1-7, 1983.

SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Bolm Téc.1, Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS. 83p. 1980.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

SILVEIRA, J. A. S.; ALBERNAZ, T. T.; SILVA, N. S.; LOPES, C. T. A.; CERQUEIRA, V. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Fotossensibilização hepatógena em caprinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no Estado do Pará. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Goiânia: Ciência Animal Brasileira, Supl. 1, 2009. p. 336-341.

SMITH, B. L.; MILES, C. O. A role for *Brachiaria decumbens* in hepatogenous photosensitization of ruminants? A letter to the editor. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 256-257, 1993.

SOUZA, R. I. C.; RIET-CORREA, F.; BRUM, K. B.; FERNANDES, C. E.; BARBOSA-FERREIRA, M.; LEMOS, R. A. A. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1036-1042, 2010.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M.A. Função hepática. In: Ibid. (Eds.), **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011. p. 562-588.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria* spp. In: **Plantas Tóxicas do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. p. 323-335.

4. CAPÍTULO 1

Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep

Tatiane C. Faccin, Franklin Riet-Correa, Fernando S. Rodrigues, Ariany C. Santos, Gleice K.A. Melo, Jonilson A. Silva, Rubiane Ferreira, Camila C.B.F. Ítavo, Ricardo A.A. Lemos

(Artigo aceito para publicação na revista Toxicon)

Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep

Tatiane C. Faccin^{1,*}, Franklin Riet-Correa^b, Fernando S. Rodrigues^c, Ariany C. Santos^a, Gleice K.A. Melo^a, Jonilson A. Silva^a, Rubiane Ferreira^a, Camila C.B.F. Ítavo^a,
Ricardo A.A. Lemos^a

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, 79074-460, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 58700-310, Paraíba, Brazil

^c Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900, Mato Grosso do Sul, Brazil

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effects of protodioscin ingestion in two different flocks of sheep: a flock of 23 crossbreed Mato Grosso do Sul Native sheep raised on *Brachiaria* spp. pastures from birth (experienced flock) in the state of Mato Grosso do Sul; and another flock (naïve flock) of 18 crossbred Dorper x Santa Inês sheep raised in the state of Paraná in *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* pastures. The two flocks grazed together in a *Brachiaria brizantha* pasture during a 140-day period in the rainy season. At the beginning of the experiment and every 14 days thereafter, blood samples were collected for determination of serum activities of gamma-glutamyl transferase (GGT) and aspartate

* Corresponding author: Tel.: +55 67 33453615; fax: +55 67 33453601.
E-mail address: tatifaccin@hotmail.com (T.C. Faccin), ricardo.lemos@ufms.br (R.A.A. Lemos).

aminotransferase (AST), and for determination of the icterus index. On the same days, samples of young, mature and old *B. brizantha* leaves were collected for protodioscin quantification. Naïve sheep were more susceptible to poisoning by *B. brizantha* than experienced sheep. Six sheep in the naïve flock were poisoned, and two of these died. Two sheep in the experienced flock were poisoned, and one of them died. The mean activities of serum GGT and AST were significantly higher in the naïve flock, also evidencing a higher susceptibility to the poison. These results suggest that flocks of sheep include animals with different degrees of resistance to *Brachiaria* spp. poisoning and that culling the susceptible animals may considerably increase of the resistance of the flock. The clinical signs and the lesions were similar to those previously reported. However, in sheep with black coats, the main clinical sign was weight loss without photosensitization-mediated dermatitis. One sheep from the experienced flock presented cirrhosis, with clinical signs of exercise intolerance. The protodioscin concentration (% DM) ranged from 0.87% to 2.58% (mean $\pm$ SD: 1.64 $\pm$ 0.58) in young leaves, 1.16% to 2.53% (1.67 $\pm$ 0.44) in mature leaves and 0.98% to 2.07% (1.52 $\pm$ 0.37) in old leaves. A negative relationship was found between saponin concentration and total cumulative precipitation.

Keywords: *Brachiaria* spp., protodioscin, hepatic photosensitization, weight loss, liver cirrhosis, poisonous plants.

1. Introduction

Due to its high dry matter production, easy cultivation, good adaptation to different soils for year-round growth, resistance to drought and low maintenance costs, *Brachiaria* spp. are the best option for grazing ruminants raised under range conditions in the Brazilian midwestern region (Castro et al., 2011; Seiffert, 1980). Despite its importance as forage in

Brazil, outbreaks of hepatic photosensitization caused by different *Brachiaria* species have been reported in cattle and sheep (Riet-Correa et al., 2011). Lambs are considered to be more susceptible than adults (Albernaz et al., 2010; Brum et al., 2007), and sheep are more susceptible than cattle (Riet-Correa et al., 2011). Protodioscin, which is a steroidal saponin, has been implicated as the cause of this disease (Brum et al., 2007).

Due to the importance of *Brachiaria* spp. in most Brazilian regions, it is very important to implement preventive and control measures for its toxicity. Two main measures have been proposed for the safe use of *Brachiaria* spp. in pastures: the use of less toxic species or varieties of *Brachiaria* and the use of resistant animals (Riet-Correa et al., 2011). The use of *B. brizantha* is a good alternative because this species is considered less toxic (Gracindo, 2009; Mustafa et al., 2012; Riet-Correa et al., 2011) and exhibits a protodioscin concentration lower than that of *Brachiaria decumbens* (Barbosa-Ferreira et al., 2011; Lima et al., 2012). However, outbreaks of poisoning by *B. brizantha* have been reported in sheep (Albernaz et al., 2010; Macêdo et al., 2008; Mustafa et al., 2012; Rissi et al., 2011). It has been demonstrated that there are differences in the resistance/susceptibility of sheep to *Brachiaria* poisoning. In a previous study conducted in *B. decumbens* pastures, it was demonstrated that naïve 4- to 6-month-old lambs that were raised in other pastures and introduced to *B. decumbens* pastures were more susceptible than were lambs of the same age raised in *Brachiaria* spp. pastures and introduced to the same pastures as the naïve sheep (Castro et al., 2011).

One of the aims of this study was to determine the effect of grazing in a *B. brizantha* pasture on two herds of sheep, one raised in a pasture of *Brachiaria* spp. in state of Mato Grosso do Sul (experienced flock) and the other raised in pasture of *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* in the state of Paraná (naïve flock). The other aim was to determine the

protodioscin concentrations in the young, mature and old leaves of this plant, and to establish their relationship with the occurrence of poisoning.

2. Materials and methods

The experiment was conducted on the farm (20°26'34.31"S 54°50'27.86"W) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) in the municipality of Terenos, state of Mato Grosso do Sul (MS), Brazil, using two different flocks of sheep. One flock (called experienced), raised in *Brachiaria* pastures from birth at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FAMEZ) in the municipality of Campo Grande, MS, Brazil was formed by 23 female crossbreed Mato Grosso do Sul Native clinically healthy sheep (Numbers 1-23) that were introduced to the experimental pasture in January 2012. At the beginning of the experiment, this flock was composed of three 5-month-old sheep (N21, N22, N23), three 11-month-old sheep (N18, N19, N20) and 17 sheep over 16-months old (N1-N17). The mean body weight of the experienced flock was 44.05 ± 12.05 kg. The naïve flock consisted of 18 (Numbers 24-41) approximately 9-month-old female crossbred Dorper x Santa Inês sheep raised in pasture of *P. notatum* and *L. multiflorum* in the state of Paraná that had not previously ingested *Brachiaria* spp. and were introduced to the same pasture as the experienced flock in October 2012 with a mean body weight of 30.37 ± 3.40 kg. The experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA) of the UFMS (protocol number 400/2012).

Blood samples were collected from all of the sheep at the beginning (Day 0) of the experiment, when the naïve flock was placed in the *B. brizantha* pasture, and every 14 days for determination of the icterus index and serum activities of gamma-glutamyl transferase (GGT) and aspartate aminotransferase (AST). Samples were collected for 140 days (Days 0-140). The biochemical analyzes were conducted using commercial kits (*Labtest, Minas*

Gerais, Brazil) and a BIOPLUS-200 semi-automatic biochemical analyzer. The potassium dichromate method was used to determine the icterus index, which represents the intensity of the plasma's yellowish color, which is caused by hyperbilirubinemia (Stockham and Scott, 2011). The reference values used for the icterus index were 2-5 U, according Kaneko et al. (1997). The reference values used for GGT and AST serum activities were determined in accordance with Stockham and Scott (2011), calculating the maximum reference value of the population as the mean pre-exposure serum activities of the naïve flock on day zero plus twice the standard deviation (SD) of 95% of the central values. Therefore, the maximum reference values used were 85.33 U/L for GGT and 155.04 U/L for AST.

On the days that blood was sampled, samples of *B. brizantha* were collected from 10 sites in the pasture. In each site, 40 young leaves (developing leaves and sprouting leaves), 40 mature leaves (totally expanded leaves) and 40 old leaves (senesced leaves) were collected, totaling 400 young leaves, 400 mature leaves and 400 old leaves on each sample obtained every 14 days. Samples were mixed, dried in the shade and split in two for performing the determinations of dry matter (DM), according to AOAC (2000) and quantification of saponin. For quantification of the saponin protodioscin, the samples were ground in a mill (2 mm mesh), and sent to the Chemical Laboratory of the UFMS. Protodioscin was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) using evaporative light-scattering detection (ELSD) according to a method proposed by Ganzera et al. (2001). For dry matter analysis the samples were performed according to AOAC (2000) method 930.15.

Percutaneous liver biopsies for histological examination and blood samples for AST and GGT determinations were obtained from the sheep that showed signs of poisoning by *Brachiaria* spp. To reduce their risk of death, the poisoned sheep were separated from the flock, placed in a corral with shade and fed *Cynodon dactylon* (Tifton grass) hay, concentrated food, and a mineral supplement. After their complete clinical recovery and the

reduction of the activities of their serum GGT and AST, these sheep were reintroduced to the *B. brizantha* pasture.

The FAMACHA[®] method was performed weekly as a strategy to control infection by the nematode *Haemonchus contortus*. Deworming was performed using Galgosantel (Closantel) when the FAMACHA[®] score was 4 or 5 (Kaplan et al., 2004). Both flocks had access to mineral supplements *ad libitum* and concentrated food in an amount equivalent to 0.5% of their body weight. Each sheep was weighed monthly. The sheep that died were necropsied, and fragments of tissue that were collected from the necropsies and the liver biopsies were fixed using 10% formalin, processed for routine histopathology and stained with hematoxylin and eosin (HE). Samples of the liver of sheep N20 were also stained with Masson trichrome for fibrous tissue detection.

Data on the rainfall during the experimental period were obtained from the National Institute of Meteorology (INMET), Centro de Monitoramento de Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul (Cemtec-MS), Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural (Agraer).

Analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to compare the serum activities of GGT and AST in the two experimental flocks. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare the protodioscin concentrations between young, mature and old *B. brizantha* leaves and to compare protodioscin with the average daily rainfall during the 14-day period before each collection and with the total cumulative precipitation. All of the analyses were performed using R (R Core Team, 2013) language and the nlme package (Pinheiro et al., 2013). The Fisher's exact test was used to compare the number of poisoned sheep in the flocks using BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

3. Results

The protodioscin concentration (% DM) ranged from 0.87% to 2.58% (mean $\pm$ SD: 1.64 ± 0.58) in the young leaves, from 1.16% to 2.52% (1.67 ± 0.44) in the mature leaves and from 0.98% to 2.07% (1.52 ± 0.37) in the old leaves (Fig. 1.a). No significant differences were observed between the protodioscin concentration in mature, young ($P = 0.86$), and old ($P = 0.39$) leaves. The experiment was performed during the rainy season, with mean daily rainfall during the 14 day periods of 2.8 mm to 12.8 mm and total cumulative precipitation of 62.2 mm to 928.6 mm (INMET, 2013; Fig. 1.b). A negative relationship was found between saponin concentration and total cumulative precipitation ($P = 0.001$; $t = -3.423$) and there was no relationship between saponin and mean daily rainfall ($P = 0.30$).

Of the 41 sheep in this experiment, eight were intoxicated and three died. Six sheep that became poisoned were from the naïve flock (N24, N25, N32, N33, N37 and N39), two of which died (N33 and N39). The other two poisoned sheep (N12 and N20) were from the experienced flock, of which one died (N20) (Table 1). The first sheep (N39) to exhibit clinical signs of poisoning did so 35 days after the start of the experiment. After 58 days, two other sheep were affected (N24 and N33). The other cases were detected at 127 (two cases), 136 and 137 days after the introduction of the naïve flock to the *B. brizantha* pasture (Table 1). The morbidity and mortality rates were 33.33% and 11.11%, respectively, for the naïve flock and 8.69% and 4.34%, respectively, for the experienced flock. There was a tendency for a difference ($P = 0.11$) in the number of poisoned sheep in each flock, with more poisoned animals in the naïve flock.

Five sheep (N12, N24, N25, N33 and N39) exhibited clinical and pathological manifestations of hepatic photosensitization, lesions restricted to the non-pigmented skin of the body or face and weight loss. The lesions were characterized by alopecia and erythema that progressed to the formation of crusts that flaked off, exposing areas of erosion. Two sheep (N33 and N39) in the naïve flock that died also presented anorexia, lethargy and

jaundice. Ewe N12 from the experienced flock exhibited anorexia and constant lip movements that developed into intense edema of the face and ears and jaundice, as well as skin lesions.

Two sheep (N32 and N37) with black pigmented skin exhibited weight loss without signs of photosensitized dermatitis. These sheep lost weight at an average rate of 5 kg per month but recovered during the period after they were removed from the *B. brizantha* pasture and began to gain weight after being reintroduced to the *B. brizantha* pasture.

The sheep with clinical signs of photosensitization and weight loss showed serum activities of AST and GGT above the maximum reference values on the day that they were removed from the pasture (Table 1). Eight sheep with clinical signs demonstrated intense yellow plasma (icterus index above 50 U), indicating jaundice, which was not clinically visible in five of the sheep (N20, N24, N25, N32 and N37).

The mean serum activities of AST and GGT in the experienced flock showed little variation (Fig. 2 and 3). In contrast, in the naïve flock the mean serum activities of GGT increased constantly until day 56 and remained above the maximum reference values from day 14 until the end of the experimental period (Fig. 3) and the mean values of AST activity exceed the maximum reference values for the flock only on day 56 (Fig. 2). At the start of the experiment there were no significant differences in AST ($P = 0.2759$) and GGT ($P = 0.0859$) serum activities between the flocks, but during the experiment serum activities of GGT ($P = 0.0003$) and AST ($P = 0.0104$) of the naïve flock were significantly higher than those of the experienced flock. Also in the naïve flock GGT and AST serum activities suffers influence of the time ($P = 0.0142$ for AST and $P < 0.0001$ for GGT) due to protodioscin intake.

The liver biopsies of the sheep with clinical signs exhibited lesions characteristic of *Brachiaria* poisoning. The structural pattern of the liver was disorganized, with moderate hepatic infiltration of macrophages with foamy cytoplasm and peripheral nuclei (foamy macrophages) in the sinusoids. Other abnormalities included swelling and vacuolization of the

cytoplasm of hepatocytes with individual necrotic cells, periportal mononuclear infiltrates, fibroblastic proliferation (N33 and N37), focal neutrophilic infiltrates (N12), multinucleated giant cells (N32) and bile retention (N12 and N33).

Sheep N20, which was the only animal that died in the experienced flock, was not removed from the pasture because it did not exhibit signs of photosensitization and showed only exercise intolerance characterized by reluctance to move and severe dyspnea when the animal was conducted to the corral with the rest of the flock. Death occurred 112 days after the beginning of the experiment, when this sheep was 15 months old. This sheep maintained the same weight from the beginning of the experiment, but showed increased serum activity of GGT (ranging from 329 to 527 U/L) in all of its blood samples. Eight months before the start of the experiment, at three months of age, this animal had exhibited photosensitivity.

Of the six poisoned sheep in the naïve flock, four recovered and were reintroduced into the *B. brizantha* pasture. Sheep N24 developed again photosensitization after being reintroduced in the pasture but recovered and showed no clinical signs throughout the rest of the experiment (Table 1).

At necropsy, two sheep (N33 and N39) from the naïve flock were found moderate to severe jaundice, a yellowish-brown and extremely firm liver, and a distended gallbladder. The kidneys were dark brown. Sheep N39 had pulmonary edema. Sheep N20, which was in the experienced flock, presented congested mucous membranes and poor body condition. Its liver was reduced in size, pale yellow, firm, irregularly shaped and contained many regenerative parenchymal nodules separated by fibrous connective tissue, which is characteristic of macronodular cirrhosis. Its gall bladder was dilated. Pulmonary edema was also present.

The microscopic lesions observed in the livers of sheep N33 and N39 exhibited structural disorganization, with heavy sinusoidal infiltrates of foamy macrophages (Fig. 4). Swelling and vacuolization of hepatocytes, cholestasis and necrosis of individual hepatocytes were also

observed. Crystals and negative images of crystals were observed within hepatocytes, macrophages and bile ducts (Fig. 5). Mild multifocal periportal fibrosis was observed in sheep N33. Low to moderate amounts of amorphous eosinophilic material was observed within Bowman's space and the tubules of the renal cortical region. The skin lesions were focally extensive coagulation necrosis in the epidermal layer, containing cellular debris and basophilic material resembling bacterial colonies, neutrophilic infiltration, hyperkeratosis and parakeratosis. No histopathological changes were observed in the other organs examined.

Histology of the liver of sheep N20 revealed the lesions characteristic of hepatic cirrhosis, with diffuse replacement of the hepatic parenchyma by fibrous connective tissue and regenerative nodules within this fibrous tissue. In some areas, the loose connective tissue had invaded the parenchyma, isolating hepatocytes and dissociating and disorganizing cords of hepatocytes. The periportal region showed moderate to intense proliferation of fibrous connective tissue that had invaded the hepatic parenchyma. Evidence of bile duct proliferation and mild lymphocytic infiltration was also observed in the periportal region. The hepatocytes were moderately vacuolated and swollen and foamy macrophages were observed in the sinusoids. In the cytoplasm of the macrophages and hepatocytes, there were negative images of crystals. Multinucleated giant cells that sometimes contained numerous negative images of crystals were also present. Many of the bile ducts contained birefringent crystals that sometimes occluded the duct. In the cortical region of the hepatic lymph nodes, multifocal and coalescent groups of foamy macrophages that sometimes had formed multinucleated giant cells were observed.

4. Discussion

Brachiaria brizantha was toxic for sheep that had not previously ingested this grass (the naïve flock) and also for the sheep raised in *Brachiaria* pastures from birth (the experienced

flock). However, there was a trend ($P = 0.11$) towards a difference in the number of affected animals in each flock, as 33.33% of the naïve flock were poisoned compared to 8.69% of the experienced flock. A high frequency of poisoning in outbreaks among naïve sheep has been reported, ranging from 16.3% to 43.4% for *B. brizantha* poisoning (Albernaz et al., 2010) and from 25% to 40.56% for *B. decumbens* poisoning (Brum et al., 2007; Lemos et al., 1996; Mendonça et al., 2008; Silva et al., 2006). Cases of poisoning still occur in flocks of sheep raised in *Brachiaria* pastures, but with a lower frequency than in flocks of naïve sheep (Castro et al., 2011; Mustafa et al., 2012). The occurrence of poisoning in flocks raised in *Brachiaria* pastures suggests that sheep do not adapt to the ingestion of this plant and that the higher resistance of experienced flocks could be due to the presence of more resistant animals in the flock due to the prior death of the susceptible sheep. In cattle, *Brachiaria* poisoning was more frequent from 1960 to 1980, after the introduction and dissemination of these grasses in Brazil, and it gradually decreased over the last 30 years, most likely due to the death of the susceptible animals and also to the replacement of *B. decumbens*, which is relatively more toxic, by the less toxic *B. brizantha* and *Brachiaria humidicola* (Riet-Correa et al., 2011). The sheep industry has expanded in midwestern Brazil over the past 10 years, with the introduction of sheep from northeastern Brazil, where *Brachiaria* spp. are less frequent than in other Brazilian regions, which explains the high incidence of *Brachiaria* poisoning in the midwest.

The higher susceptibility of the naïve flock was also suggested by the higher serum activities of GGT and AST observed in the naïve flock compared with that of the experienced flock, but as suggested previously (Castro et al., 2011), the level of GGT activity is a better indicator of *Brachiaria* poisoning than is the level of AST activity. The higher GGT activities in the naïve flock during the whole experiment suggested that the GGT activities may be a good indicator of resistance; moreover, the higher GGT activities in the sera of the sheep

without clinical signs of toxicity in both of the flocks is most likely an indication of their resilience, as was suggested previously for sheep (Riet-Correa et al., 2011) and buffalo (Riet-Correa et al., 2010).

Taken together, the data discussed above suggested that a flock of sheep includes animals with different degrees of resistance to *Brachiaria* spp. poisoning and that culling the susceptible animals may considerably increase the resistance of the flock. Therefore, eliminating animals that exhibit clinical signs of the disease is important to increasing the resistance of the flock; however, other forms of selection should be investigated, such as using the serum activities of GGT to identify the resistant or resilient sheep. It has been demonstrated that animals susceptible to sporidesmin that is produced by *Pithomyces chartarum* have increased GGT serum activities after exposition to this mycotoxin, while in resistant animal GGT serum activities remain within normal ranges (Towers, 2006). After the first outbreaks of *Brachiaria* spp. poisoning in Brazil several authors have blamed *P. chartarum* as the cause of the disease, but later it was clearly demonstrated that *P. chartarum* is not present or is present in very low amounts in most toxic pastures, and that most *P. chartarum* strains isolated from Brazil do not contain sporidesmin (Riet-Correa et al., 2011).

The period between the introduction of the naïve sheep to the *B. brizantha* pasture and the manifestation of clinical signs of poisoning ranged from 35 to 137 days in the present study. Previous studies on *Brachiaria* poisoning in sheep also showed variations in this period. The occurrence of poisoning cases only 7 days after naïve sheep had entered such a pasture was reported by Santos Jr (2008), although most reports described the appearance of cases 15-60 days after the sheep were introduced to this grass (Albernaz et al., 2010; Brum et al., 2007; Castro et al., 2011; Gracindo, 2009; Macêdo et al., 2008; Saturnino et al., 2010; Salam Abdullah et al., 1988, 1989). The peak mean activity of serum GGT in the naïve flock occurred 28 days after the peak protodioscin level in the young and mature leaves was

reached. Similarly, the levels of serum GGT began to decline 28 days after the protodioscin content of the young and mature leaves began to decline. These data indicated that the increased levels of protodioscin in the pasture were not accompanied by immediate increases in the mean serum activities of GGT, which can be explained by the time required for continuous protodioscin ingestion to cause liver damage. This finding differs from that observed in poisoning by other hepatotoxic plants, such as *Senecio brasiliensis* (Grecco et al., 2012), *Crotalaria retusa* (Anjos et al., 2010) and *Enterolobium contortisiliquum* (Pessoa et al., 2013), in which continued administration of non-toxic doses induces resistance.

The main clinical manifestation of *Brachiaria* poisoning that was observed was photodermatitis with jaundice. Jaundice was observed clinically in three sheep and was diagnosed in five others after determining the icterus index of their plasma. In this test, an intensely yellow plasma indicates jaundice (Kaneko et al., 1997; Radostits et al., 2007). The clinical signs of dermatitis due to photosensitivity that was observed in this experiment were similar to those reported previously in spontaneous outbreaks of poisoning by *Brachiaria* spp. (Albernaz et al., 2010; Brum et al., 2007; Graydon et al., 1991; Lemos et al., 1996; Macêdo et al., 2008; Mendonça et al., 2008; Mustafa et al., 2012; Silva et al., 2006) or in experimentally poisoned sheep (Cruz et al., 2000; Driemeier et al., 2002; Opasina, 1985; Salam Abdullah et al., 1988, 1989), except that the black animals did not exhibit dermatitis, only weight loss, and one animal from the experienced flock that died due to hepatic cirrhosis exhibited only exercise intolerance. Based on the histological abnormalities observed in their hepatic biopsies, the weight loss of the two sheep with black coats that lacked photodermatitis lesions could also be attributed to liver injury caused by ingesting *B. brizantha*. The absence of photosensitization-mediated dermatitis in sheep with black coats that were poisoned by *Brachiaria* spp. has been reported previously (Graydon et al., 1991; Santos Jr, 2008;

Saturnino et al., 2010) and is explained by the pigmentation in the skin protecting it from solar radiation.

Sheep N20 displayed the gross and microscopic characteristics of liver cirrhosis due to poisoning by *Brachiaria* spp., which was demonstrated by the presence of birefringent crystals in the bile ducts and negative images of these crystals in giant cells and foamy macrophages. This condition has not been reported previously in sheep that consumed *Brachiaria* spp. Although this sheep was affected by cirrhosis and had exhibited photosensitivity at three months of age, before the start of the experiment, the only sign of toxicity it exhibited during the experiment was exercise intolerance without weight loss. Due to the chronic nature of the lesions, it was not possible to determine whether cirrhosis resulted from the continuous ingestion of protodioscin present in the pasture during the experiment or was a consequence of the progression of lesions that were caused 8 months before the start of the experiment, when the animal showed photosensitization.

The protodioscin concentrations in the young (mean $\pm$ SD: 1.64 $\pm$ 0.58% DM), mature (1.67 $\pm$ 0.44) and old (1.52 $\pm$ 0.37) leaves of the grass were similar, suggesting that the sheep habit of selecting young leaves did not account for the occurrence of the disease. These results differ from those reported of Ferreira et al. (2011), who found higher protodioscin concentrations in young leaves (1.80% to 4.65%) than in mature leaves (0.75% to 3.10%) or old leaves (0.30% to 1.03%). However, it is not possible to compare different studies due to the lack of standardization in the sampling methods and due to variations in the results depending on the time elapsed between collection and analysis. It was demonstrated that the protodioscin concentration decreased 36% over the first three days after haymaking and then remained constant (Lima, 2012).

A negative relationship between saponin concentration and total cumulative precipitation found in this study was also observed by Lima et al. (2012). There was also a decrease in the

saponin concentrations in the second part of the experiment as the plant matured. Similar results were obtained by Castro et al. (2011) and Lima et al. (2012) who suggested that age of the plant is the major influence on saponin concentrations and not the precipitation.

In conclusion, the naïve sheep were more susceptible to poisoning by *Brachiaria* spp. than were the sheep from a flock raised on this forage; however, both the naïve and experienced flocks included sheep with different levels of susceptibility, and selecting the resistant animals should be a method to control this type of poisoning. Young, mature and old *B. brizantha* leaves have similar protodioscin concentration and there is a negative relationship between saponin concentration and total cumulative precipitation. It was also concluded that poisoning by *Brachiaria* spp. can occasionally cause cirrhosis in sheep.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq number 14/2011 - Projeto Universal Proc. 483211/2012-5) and by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o Controle das Intoxicações por Plantas (INCT/CNPq, Proc. 573534/2008-0).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- 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., 2010. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 30 (9), 741-748.

- Anjos, B.L., Nobre, V.M.T., Dantas, A.F.M., Medeiros, R.M.T., Oliveira Neto, T.S., Molyneux, R.J., Riet-Correa, F., 2010. Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: Acquired resistance by continuous administration of low doses. *Toxicon* 55, 28-32.
- AOAC, 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed., MD, Gaithersburg.
- Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2007. BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Belém. 290p.
- Barbosa-Ferreira, M., Brum, K.B., Oliveira, N.M.R., Valle, C.B., Ferreira, V.B.N., Garcez, V.S., Riet-Correa, F., Lemos, R.A.A., 2011. Concentração da saponina esteroideal protodioscina em diferentes espécies e cultivares de *Brachiaria* spp. *Vet e Zootec.* 18 (4 Supl. 3), 98-113.
- Brum, K.B., Haraguchi, M., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Fioravanti, M.C., 2007. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesq. Vet. Bras.* 27 (1), 39-42.
- 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., 2011. *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings, in: Riet-Correa, F., Pfister, J., Schild, A.L., Wierenga, T.L. (Eds.), *Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins*. CAB International, Wallingford, pp. 110-117.
- Cruz, C., Driemeier, D., Pires, V.S., Colodel, E.M., Taketa, A.T.C., Schenkel, E.P., 2000. Isolation of steroidal sapogenins implicated in experimentally induced cholangiopathy of sheep grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 42 (3), 142-145.

- Driemeier, D., Colodel, E.M., Seitz, A.L., Barros, S.S., Cruz, C.E.F., 2002. Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. *Toxicon* 40, 1027-1031.
- Ferreira, M.B., Brum, K.B., Fernandes, C.E., Martins, C.F., Pinto, G.S., Castro, V.S., Rezende, K.G., Riet-Correa, F., Haraguchi, M., Wysocki, H.L., Lemos, R.A.A., 2011. Variation in saponin concentration in *Brachiaria brizantha* leaves as a function of maturation: preliminary data, in: Riet-Correa, F., Pfister, J., Schild, A.L., Wierenga, T.L. (Eds.), *Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins*. CAB International, Wallingford, pp. 118-123.
- Ganzer, M., Bedir, E., Khan, I.A., 2001. 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.
- Gracindo, C.V., 2009. Avaliação do desempenho e da toxicidade em ovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum* var Aires, *Andropogon gayanus* var Planaltina. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 90p.
- Graydon, R.J., Hamid, H., Zahari, P., Gardiner, C., 1991. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. *Aust. Vet. J.* 68, 234-236.
- Grecco, F.B., Estima-Silva, P., Marcolongo-Pereira, C., Soares, M.P., Raffi, M.B., Schild, A.L., 2012. Intoxicação experimental aguda por *Senecio brasiliensis* em ovinos e indução de resistência à intoxicação. *Pesq. Vet. Bras.* 32 (9), 912-916.
- INMET, 2013. Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Available at: www.agraer.ms.gov.br/cemtec (accessed 29.08.13).

- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 5th ed. Academic Press, San Diego. 932p.
- Kaplan, R.M., Burke, J.M., Terril, T.H., Miller, J.E., Getz, W.R., Mobini, S., Valencia, E., Williams, M.J., Williamson, L.H., Larsen, M., Vatta, A.F., 2004. Validation of the FAMACHA[®] eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Veterinary Parasitology* 123, 105–120.
- Lemos, R.A.A., Ferreira, L.C.L., Silva, S.M., Nakazato, L., Salvador, S.C., 1996. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural* 26 (1), 109-113.
- 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., 2012. Weather and plant age affect the levels of steroidal saponin and *Pithomyces chartarum* spores in *Brachiaria* grass. *IJPPR* 2, 45-53.
- Lima, F.G., 2012. Fatores que interferem nas concentrações de saponinas em braquiárias e intoxicação experimental em bovinos. Tese de Doutorado em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 77p.
- Macêdo, J.T.S.A., Riet-Correa, F., Dantas, A.F.M., Simões, S.V.D., 2008. Doenças da pele em caprinos e ovinos no semi-árido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 28 (12), 633-642.
- Mendonça, F.S., Camargo, L.M., Freitas, S.H., Dória, R.G.S., Baratella-Evêncio, L., Evêncio Neto, J., 2008. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Graminae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Ciênc. Anim. Bras.* 9 (4), 1034-1041.
- Mustafa, V.S., Moscardini, A.R.C., Borges, J.R.J., Reckziegel, G.C., Riet-Correa, F., Castro, M.B., 2012. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. *Pesq. Vet. Bras.* 32 (12), 1272-1280.

- Opasina, B.A., 1985. Photosensitization jaundice syndrome in West African dwarf sheep and goats grazed on *Brachiaria decumbens*. Trop. Grasslands 19 (3), 120-123.
- Pessoa, C.R.M., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F., 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 33 (6), 752-758.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., 2013. R Development Core Team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-113.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., 2007. Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 10th ed. Elsevier, Philadelphia. 2156p.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: www.R-project.org/.
- Riet-Correa, B., Castro, M.B., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, G., Mustafa, V., Riet-Correa, F., 2011. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. Pesq. Vet. Bras. 31 (3), 183-192.
- Riet-Correa, B., Riet-Correa, F., Oliveira Junior, C.A., Duarte, V.C., Riet-Correa, G., 2010. Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. Pesq. Vet. Bras. 30 (9), 705-711.
- Rissi, D.R., Sant'Ana, F.J.F., Pierezan, F., Anjos, B.L., Barros, C.S.L., 2011. Poisonous plants affecting sheep in Southern Brazil, in: Riet-Correa, F., Pfister, J., Schild, A.L., Wierenga, T.L. (Eds.), Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins, CAB International, Wallingford, pp. 73-78.
- Salam Abdullah, A., Noordin, M.M., Rajion, M.A., 1988. Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in sheep: Changes in motility and pH of reticulo-rumen. Vet. Hum. Toxicol. 30 (3), 256-258.

- Salam Abdullah, A., Noordin M.M., Rajion, M.A., 1989. Neurological disorders in sheep during signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity. Vet. Hum. Toxicol. 31 (2), 128-129.
- Santos Jr, H.L., 2008. 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. 65p.
- Saturnino, K.C., Mariani, T.N., Barbosa-Ferreira, M., Brum, K.B., Fernandes, C.E.S., Lemos, R.A.A., 2010. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. Pesq. Vet. Bras. 30 (3), 195-202.
- Seiffert, N.F., 1980. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Bolm Téc.1, Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS. 83p.
- Silva, D.M., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T., Oliveira, O.F., 2006. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. Pesq. Vet. Bras. 26 (4), 223-236.
- Stockham, S.L., Scott, M.A., 2011. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária, second ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 729p.
- Towers, N.R., 2006. Mycotoxin poisoning in grazing livestock in New Zealand. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 66, 300-306.

Figure Caption

Fig. 1. (a) Protodioscin concentrations (% DM) in the young, mature and old *B. brizantha* leaves and (b) total cumulative precipitation (INMET, 2013) during the experimental period (from October 2012 to March 2013).

Fig. 2. Mean serum activities of AST in the naïve and experienced flocks during 140 days ingesting *B. brizantha*. Maximum reference value: 155.04 U/L.

Fig. 3. Mean serum activities of GGT in the naïve and experienced flocks during 140 days ingesting *B. brizantha*. Maximum reference value: 85.33 U/L.

Fig. 4. Hepatic structural disorganization, with vacuolated hepatocytes heavy sinusoidal infiltrates of foamy macrophages (black arrows) and necrosis of individual hepatocytes (white arrow). HE. Bar = 50 μ m.

Fig. 5. Histological section of liver from a naïve sheep intoxicated by *B. brizantha*. Negative images of crystals are observed within bile ducts. HE. Bar = 50 μ m.

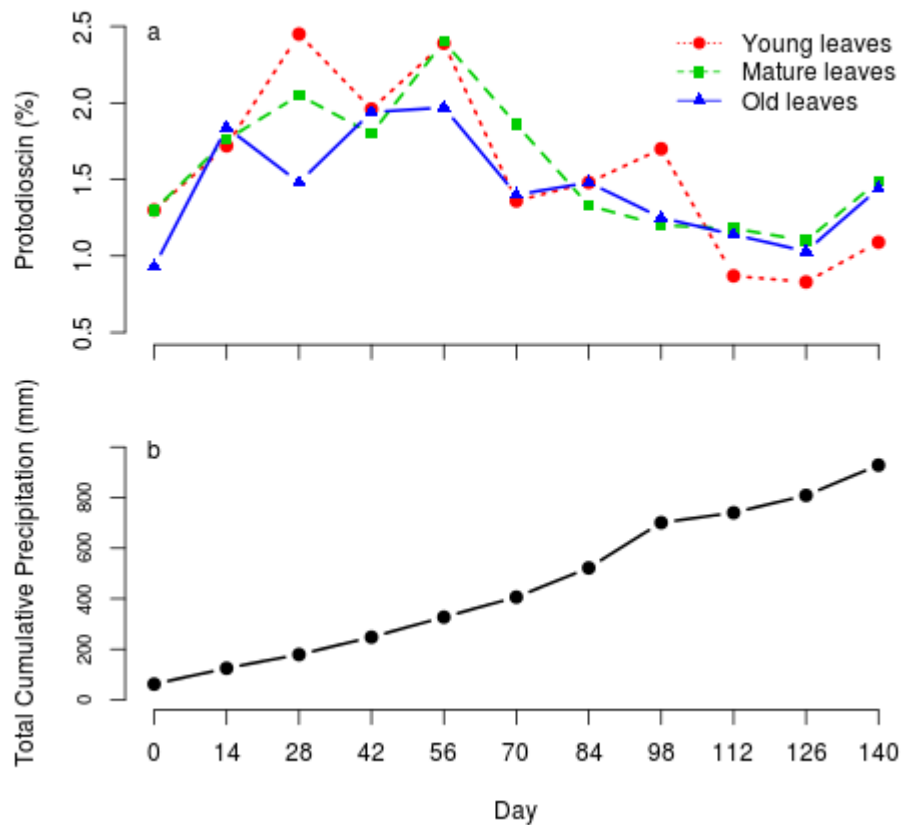


Fig. 1. (a,b)

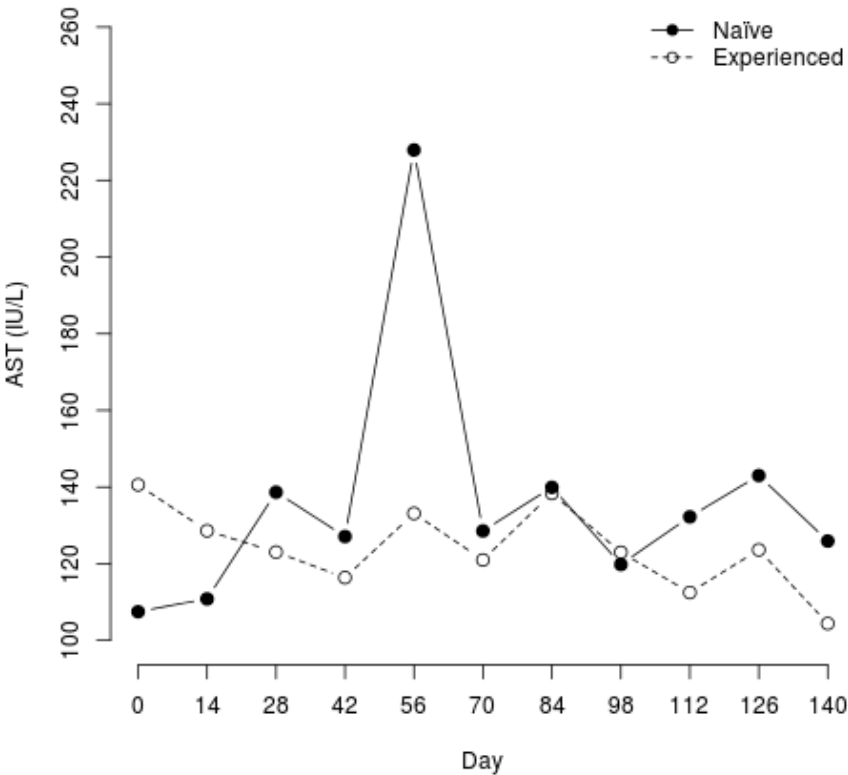


Fig. 2.

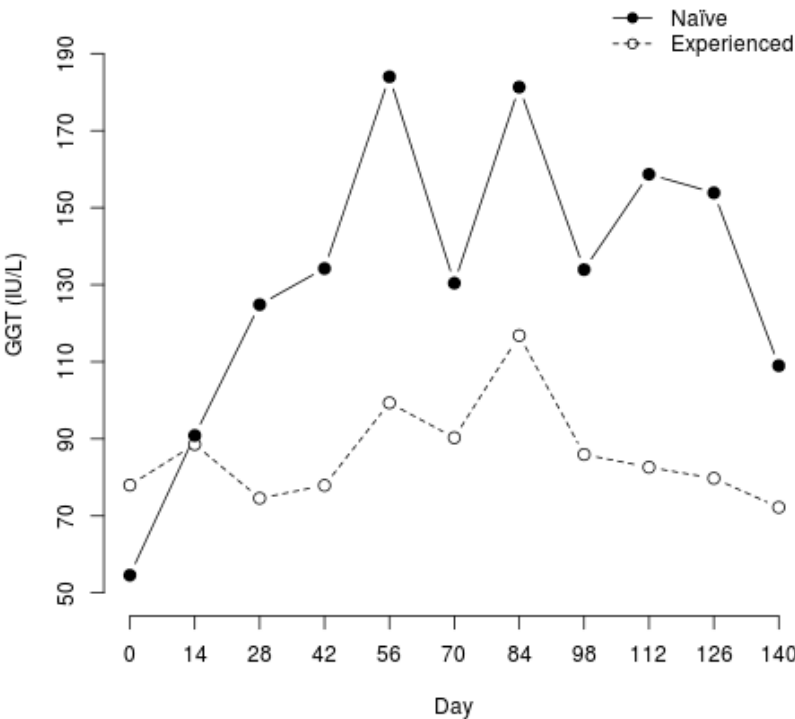


Fig. 3.

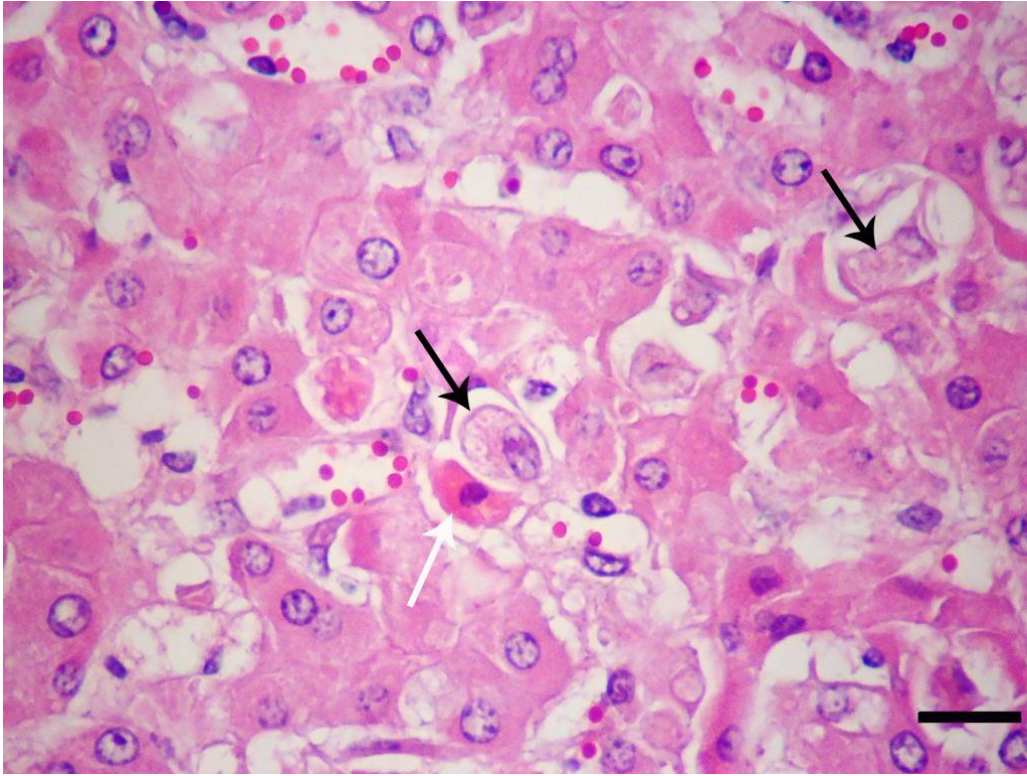


Fig. 4.

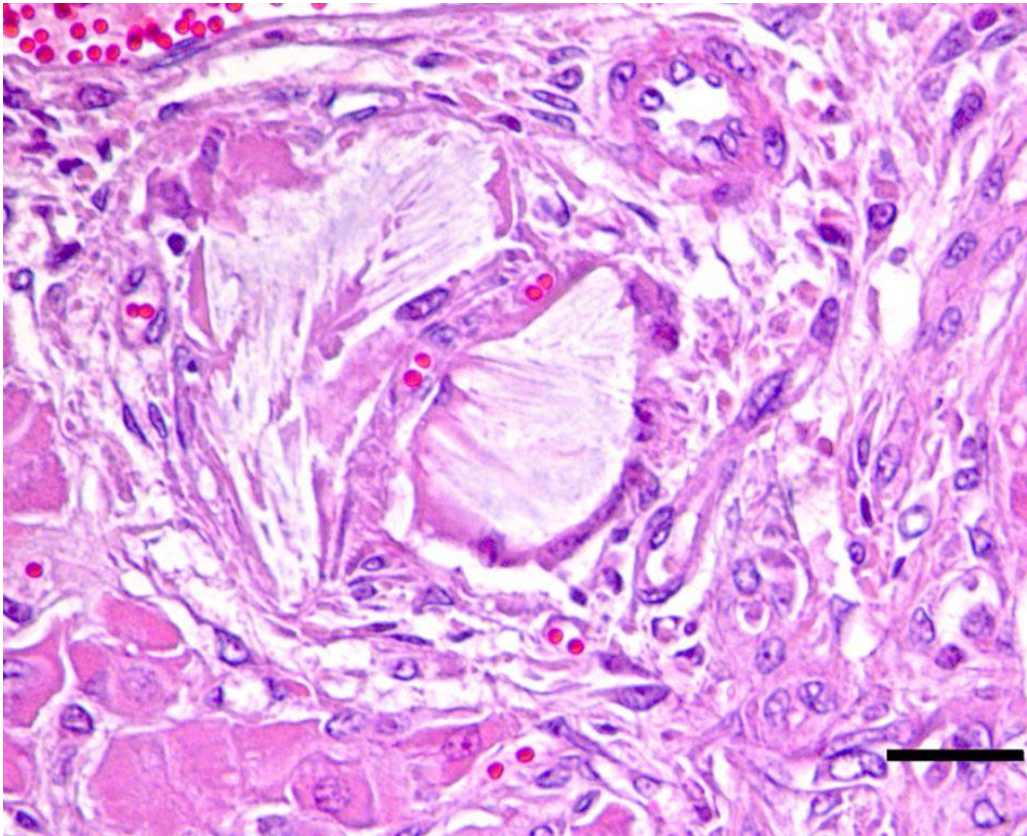


Fig. 5.

Table 1. Serum activities of GGT and AST (on the day that the sheep were removed from the pasture) and the outcome of the poisoning of the sheep that showed clinical signs of toxicity while grazing in the *B. brizantha* pasture

Sheep	Flock	GGT/AST (U/L)	OCS* (day)	Recovery (day)	Death (day)
N12	Experienced	275/649	123	150	-
N20	Experienced	-	-	-	112
N24	Naïve	520/350	58	70	-
N24	Naïve	451/209	127	140	-
N25	Naïve	298/471	136	150	-
N32	Naïve	459/361	137	150	-
N33	Naïve	397/361	58	-	68
N37	Naïve	221/429	127	136	-
N39	Naïve	229/429	35	-	44

*OCS: Onset of clinical signs; the maximum reference values were 85.33 U/L for GGT and 155.04 U/L for AST.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados obtidos no estudo que compõe esta dissertação permitiram concluir que:

- Ovinos *naive* são mais susceptíveis à intoxicação por *B. brizantha* que ovinos criados nesta forragem, embora ambos os rebanhos incluam ovinos com diferentes níveis de susceptibilidade.
- A seleção de animais resistentes pode ser um método de controle deste tipo de intoxicação.
- A intoxicação por *Brachiaria* spp. pode ocasionalmente causar cirrose em ovinos.
- A concentração de protodioscina é semelhante em folhas novas, maduras e senescentes de *B. brizantha*.
- Há uma relação negativa entre a concentração de saponina e a precipitação total acumulada.

É importante a padronização na metodologia de coleta da pastagem, incluindo a determinação da concentração de protodioscina em base de matéria seca.

São necessários estudos com delineamentos específicos para verificar o efeito da nutrição na ocorrência da intoxicação.