

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Avaliação Lectino-histoquímica de Fígado e Linfonodo
Mesentérico de Búfalos Mantidos em Pastagens de *Brachiaria* spp**

Ileana Costa Miranda

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**AVALIAÇÃO LECTINO-HISTOQUÍMICA DE FÍGADO E
LINFONODO MESENTÉRICO DE BÚFALOS MANTIDOS EM
PASTAGENS DE *Brachiaria spp***

ILEANA COSTA MIRANDA

Sob a orientação da Professora
Ticiano do Nascimento França

e Co-orientação da Professora
Gabriela Riet-Correa

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Ciências**, Área de concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2015

633.2

M672a

T

Miranda, Ileana Costa, 1991-
Avaliação lectino-histoquímica
de fígado e linfonodo mesentérico
de búfalos mantidos em pastagens de
Brachiaria spp / Ileana Costa
Miranda - 2015.
69 f.: il.

Orientador: Ticiania do
Nascimento França.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária - Patologia
e Ciências Clínicas.

Bibliografia: f. 42-50.

1. Plantas forrageiras - Teses.
2. Saponinas - Teses. 3. Lectinas -
Avaliação - Teses. 4. Histoquímica
- Teses. 5. Fígado - Histoquímica
- Teses. 6. Búfalo - Teses. I.
França, Ticiania do Nascimento,
1974-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária - Patologia e Ciências
Clínicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ILEANA COSTA MIRANDA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/12/2015

Ticiano do Nascimento França, MV, Dr.^a, UFRRJ
Orientadora

Josilene Nascimento Seixas, MV, Dr.^a, UFLA

Flávio Augusto Soares Graça, MV, Dr., UENF

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão, Elias Melo de Miranda, Maria do Socorro Costa Miranda e Eluan Costa Miranda, pelo apoio incondicional e fonte inesgotável de inspiração.

Ao meu noivo, Rodrigo Piccoli Pinheiro Machado, pelo amor e companheirismo que me fortalecem diariamente.

Aos amigos da Anatomia Patológica, Ana Paula Pires, André Marandola, Daniel Ubiali, Gabriela Cid, Letícia Pinto, Mariana d'Avila, Rhudson Vilarinho, Samay Zillmann e Taïna Gonçalves, pelo suporte profissional, carinho, amizade e ótima convivência diária.

Aos professores Carlos Hubinger Tokarnia (*in memoriam*), Marilene de Farias Brito, Paulo Vargas Peixoto e Vivian de Assunção Nogueira, pela sabedoria a qual tenho orgulho em me espelhar.

Em especial, à minha orientadora, Ticiano do Nascimento França, pela orientação que vai além da rotina profissional e por toda a confiança em mim depositada.

À Gabriela Riet-Correa, pela co-orientação e disponibilização do material utilizado neste trabalho.

Ao PPGMV (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) pela oportunidade de realização do curso de mestrado e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

MIRANDA, Ileana Costa. **Avaliação lectino-histoquímica de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp.** 57 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Animais que se alimentam em pastos de *Brachiaria* spp comumente apresentam macrófagos espumosos isolados ou agrupados no fígado, além de cristais no interior de ductos biliares. A patogênese da formação e a natureza do material armazenado nestas células, contudo, ainda não são completamente conhecidas. Através da avaliação lectino-histoquímica, saponinas esteroidais (metabólitos glicosilados secundários) têm sido identificadas nos cristais e no citoplasma das células espumosas, que provavelmente são responsáveis por danificar o fígado e levar ao acúmulo de filoteritina. Por meio deste trabalho, objetivou-se padronizar e caracterizar a utilização da lectino-histoquímica na detecção de metabólitos glicosilados nos tecidos de búfalos mantidos em diferentes pastos de *Brachiaria* spp no Brasil. Fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de 40 animais foram analisados: 10 búfalos mantidos em pastagem predominante de *B. decumbens* por aproximadamente 12 meses; 10 búfalos mantidos em pastagem predominante de *B. brizantha* por aproximadamente 18 meses; 10 búfalos mantidos em pastagem de *B. brizantha* por aproximadamente quatro anos; e, como controle negativo, 10 búfalos mantidos em pastagem livre de *Brachiaria* spp desde o nascimento. Quatorze lectinas foram testadas (Con-A, SBA, WGA, DBA, UEA, RCA, PNA, GSL-I, PSA, LCA, PHA-E, PHA-L, SJA e SWGA), em um total de 1120 fragmentos avaliados. Estudos anteriores demonstraram que a lectina PNA possui marcada reatividade para macrófagos espumosos de bovinos e ovinos. No presente estudo, a lectina SWGA apresentou acentuada reatividade e alta especificidade para macrófagos espumosos; WGA, GSL, PHA-E e PHA-L mostraram moderada a acentuada reatividade, mas baixa especificidade aos macrófagos espumosos; as outras lectinas não apresentaram reatividade ou especificidade significativas. Ainda não se sabe exatamente a que atribuir a diferença de reatividade aos macrófagos espumosos. Sugere-se que divergências ocorram em função da espécie de *Brachiaria* ingerida, da fase de crescimento da planta, do tipo e proporção dos glicoconjugados armazenados na planta em decorrência da época do ano, das diferenças no metabolismo da espécie do animal em questão, da presença de fotossensibilização, da evolução clínica da doença e do tempo de ingestão da planta. Não houve diferença de marcação significativa entre os fragmentos coletados de animais que se alimentaram de *B. decumbens* por 12 meses e *B. brizantha* por 18 meses. Porém, a diminuição da presença e marcação lectino-histoquímica dos macrófagos espumosos nos tecidos dos búfalos que ingeriram *B. brizantha* durante mais tempo indica que os animais podem passar por um processo de adaptação de acordo com o tempo de ingestão da planta. A avaliação lectino-histoquímica pode ser utilizada para caracterizar o material armazenado em macrófagos espumosos presentes no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos que se alimentam em pastagens de *Brachiaria* spp e ajuda na compreensão da patogênese de formação destas células.

Palavras-chave: *Brachiaria*, saponinas, lectino-histoquímica.

ABSTRACT

MIRANDA, Ileana Costa. **Lectin histochemistry evaluation of liver and mesenteric lymph node of buffaloes kept in *Brachiaria* spp.** 57 p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Animals grazing *Brachiaria* spp commonly present foamy macrophages isolated or grouped in the liver, and crystals within biliary ducts. The pathogenesis of formation and the nature of the material stored on these cells, however, are not completely known. Through lectin histochemistry evaluation, steroidal saponins (secondary glycosylated metabolites) have been identified in the crystals and within the cytoplasm of the foam cells, which are probably liable for damage the liver leading to accumulation of phylloerythrin. This study aims to standardize the use of lectin histochemistry to detect glycosylated metabolites in tissues of buffaloes kept in different *Brachiaria* spp pastures in Brazil. Fragments of liver and mesenteric lymph node from 40 animals were analyzed: 10 buffaloes that were kept in predominant pasture of *B. decumbens* for 12 months; 10 buffaloes that were kept in pasture with a predominance of *B. brizantha* for 18 months; 10 buffaloes that were kept in pasture of *B. brizantha* for approximately four years; and, as a negative control, 10 buffaloes that were maintained in native pasture without *Brachiaria* spp since birth. Fourteen lectins were tested (Con-A, SBA, WGA, DBA, UEA, RCA, PNA, GSL-I, PSA, LCA, PHA-E, PHA-L, SJA and SWGA), in a total of 1120 evaluated fragments. Previous studies demonstrated that PNA showed great binding reactivity for foamy macrophages in bovine and ovine. In the present study, SWGA presented high specificity and marked binding reactivity for foamy macrophages; WGA, GSL, PHA-E and PHA-L showed moderate to marked reactivity but low specificity for foamy macrophages; the other lectins didn't show significant reactivity or specificity. It remains unclear why there is this difference in lectins binding reactivity to foamy macrophages; it is suggested that divergences may occur depending on the species of *Brachiaria* ingested, the plant growth stage, the type and proportion of saponins stored in the plant due to seasonality, the differences in the metabolism of animal species, the presence of photosensitivity, the clinical course of the disease and the plant intake time. Moreover, there was no significant reactivity difference between the collected fragments of animals that grazed in *B. decumbens* for 12 months and *B. brizantha* for 18 months. However, the decreased presence of foamy macrophages and its lectin histochemical binding in animals that fed on *B. brizantha* for a longer time indicates that the animals can pass through an adaptation process according to the the plant intake time. Lectin histochemistry analysis can be used to characterize the material stored in foamy macrophages present in liver and mesenteric lymph node of buffaloes that graze in *Brachiaria* spp pastures and helps to clarify the pathogenesis of these cells.

Key-words: *Brachiaria*, saponins, lectin histochemistry.

ÍNDICE DE TABELAS

		PÁGINA
Tabela 1	Lectinas e propriedades específicas.	10
Tabela 2	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina Con A no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	24
Tabela 3	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina SBA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	24
Tabela 4	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina WGA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	24
Tabela 5	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina DBA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	25
Tabela 6	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina UEA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	25
Tabela 7	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina RCA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	25
Tabela 8	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PNA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	26
Tabela 9	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina GSL I no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	26
Tabela 10	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PSA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	26

Tabela 11	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina LCA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	27
Tabela 12	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PHA-E no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	27
Tabela 13	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PHA-L no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	27
Tabela 14	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina SJA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	28
Tabela 15	Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina SWGA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.	28
Tabela 16	Resumo das avaliações lectino-histoquímicas em macrófagos espumosos presentes no fígado de animais que se alimentaram de <i>Brachiaria</i> spp.	38

ÍNDICE DE QUADROS

		PÁGINA
Quadro 1	Resultados da avaliação lectino-histoquímica em fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de <i>Brachiaria</i> spp (controle).	16
Quadro 2	Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de <i>Brachiaria decumbens</i> por aproximadamente 10 meses.	18
Quadro 3	Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de <i>Brachiaria brizantha</i> por aproximadamente 18 meses.	20
Quadro 4	Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de <i>Brachiaria decumbens</i> por aproximadamente 4 anos.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Mapa dos municípios do estado do Pará. Ilha de Marajó (verde): grupo controle negativo; Ourém (azul): búfalos mantidos em <i>B. decumbens</i> por aproximadamente 12 meses; Paragominas (vermelho): búfalos mantidos em <i>B. brizantha</i> por aproximadamente 18 meses; Rondon do Pará: búfalos mantidos em <i>B. brizantha</i> por aproximadamente quatro anos.	13
Figura 2	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> por 10 meses. Acentuada marcação e alta especificidade para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x	29
Figura 3	Corte histológico de linfonodo mesentérico de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> por 10 meses. Acentuada marcação para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 10x	29
Figura 4	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Acentuada marcação e alta especificidade para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x	30
Figura 5	Corte histológico de linfonodo mesentérico de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Acentuada marcação para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 10x	30
Figura 6	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> por 10 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina WGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x	31
Figura 7	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina WGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x	31
Figura 8	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> por 10 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina GSL I em macrófagos espumosos. Obj. 20x	32
Figura 9	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina GSL I em macrófagos espumosos. Obj. 20x	32

Figura 10	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> por 10 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-E em macrófagos espumosos. Obj. 20x	33
Figura 11	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-E em macrófagos espumosos. Obj. 20x	33
Figura 12	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> por 10 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-L em macrófagos espumosos. Obj. 20x	34
Figura 13	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-L em macrófagos espumosos. Obj. 20x	34
Figura 14	Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> por 18 meses. Ausência de marcação para a lectina PNA em macrófagos espumosos. Obj. 20x	35

SUMÁRIO

	PÁGINA
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Intoxicação por plantas em búfalos no Brasil	3
2.2 Fotossensibilização	3
2.3 Intoxicação por <i>Brachiaria</i> spp	3
2.3.1 Intoxicação por <i>Brachiaria</i> spp em búfalos	5
2.4 Saponinas	6
2.4.1 Variação da concentração de saponinas em <i>Brachiaria</i> spp	7
2.5 Lectinas	8
2.5.1 Estruturas e aspectos gerais	8
2.5.2 Aplicação das lectinas em diagnóstico	9
2.5.3 Uso das lectinas como marcadores tissulares	9
2.6 Emprego das lectinas na detecção de substâncias nos tecidos	11
2.6.1 Uso das lectinas na detecção de saponinas	11
2.6.2 Uso das lectinas na detecção de outras substâncias	11
2.7 Vantagens comparativas do uso de lectinas em relação a outras técnicas	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local	13
3.2 Amostras de tecidos	13
3.3 Lectinas	14
3.4 Avaliação das lâminas	14
4 RESULTADOS	15
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÕES	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8 ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se comprovado que os prejuízos econômicos determinados pela intoxicação por plantas no Brasil são muito mais elevados do que originalmente se pensava (TOKARNIA et al., 2012). Estima-se que pelo menos um milhão de bovinos morrem, anualmente, intoxicados por plantas (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001). No Brasil, surtos de fotossensibilização hepatógena em bovinos, ovinos e, por vezes, em caprinos e búfalos determinam perdas econômicas muito significativas, não tanto pelas mortes, mas, em especial, pela queda, temporária ou não, da produtividade (TOKARNIA et al., 2012).

Considerando a importância da bubalinocultura para a região Norte do Brasil, assim como o fato de que as principais forrageiras introduzidas nesta região são diferentes espécies de *Brachiaria*, Riet-Correa et al. (2010) avaliaram fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos provenientes de abatedouro que foram mantidos em pastos de *Brachiaria* spp. Foram relatadas quantidades variáveis de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos mesentéricos; as alterações nos hepatócitos foram encontradas principalmente na região centrolobular e eram mais acentuadas nas áreas onde havia maior infiltração de macrófagos espumosos, assim como nas áreas de fibrose capsular (RIET CORREA et al., 2010). Entretanto, a formação e o tipo de material armazenado nos macrófagos espumosos que ocorrem no fígado de animais mantidos em pastos de *Brachiaria* spp ainda não são completamente conhecidos.

A detecção e quantificação de princípios tóxicos de plantas, de forma geral, por meio de análises químicas de tecidos animais e plantas é excessivamente trabalhosa, demanda longo prazo e implica em custos elevados (BURAKOVAS et al., 2007). Mas sabe-se que testes lectino-histoquímicos podem detectar algumas substâncias no tecido sobre o qual ocorre a lesão e permitem estabelecer correlações entre a sua presença e quantidade, gravidade da lesão e extensão do processo. Já há algum tempo demonstrou-se a utilidade da lectino-histoquímica na detecção de substâncias complexas que contêm açúcar em tecidos animais, relacionadas ou não com doenças do armazenamento, como as glicoproteínoses (ex: manosidose) (DRIEMEIER et al., 2000; ARMIÉN et al., 2007) e as glicolipídoses (ex: gangliosidose, galactosidose) (ALROY et al., 1986; MURNAME; AHERN-RINDELL; PRIEUER, 1989). A avaliação lectino-histoquímica também pode auxiliar no estudo da formação dos macrófagos espumosos que ocorrem nos animais que se alimentam de *Brachiaria* spp e na detecção dos resíduos de açúcares específicos que estão presentes no citoplasma das células espumosas, além de contribuir no avanço da compreensão da patogênese e, conseqüentemente, favorecer a tomada de medidas profiláticas adequadas.

De fato, por meio da lectino-histoquímica, alguns autores conseguiram detectar saponinas esteroidais (metabólitos glicosilados) em macrófagos espumosos de bovinos de matadouro que se alimentavam em pastos de *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha* (GOMAR et al., 2005). As lectinas PNA, WGA e SBA foram as que demonstraram maior afinidade pelos macrófagos espumosos. Este estudo abriu excelentes possibilidades para investigação de doenças, inclusive com etiologia desconhecida, que sejam determinadas pela ingestão de substâncias tóxicas. A seguir, fígados e linfonodos de ovinos, sem fotossensibilização, que se alimentavam exclusivamente de *Brachiaria* spp foram avaliados pela técnica de lectino-histoquímica (BOABAID et al., 2011). As lectinas Con-A, RCA, WGA, LCA e PHA-L foram as que apresentaram reatividade mais acentuada em macrófagos espumosos. Posteriormente, outro estudo realizado com fragmentos de fígado e rim de ovinos com fotossensibilização, mantidos em pastagem de *B. decumbens*, foram avaliados pela técnica de lectino-histoquímica (COSTA et al., 2013). As lectinas PNA, WGA, SBA, GSL I e LCA mostraram melhor afinidade de ligação com macrófagos espumosos.

Estudos similares já foram feitos em bovinos (GOMAR et al., 2005) e ovinos (BOABAID et al., 2011, COSTA et al., 2013) que ingeriram *Brachiaria* spp, no entanto este trata-se do primeiro estudo lectino-histoquímico realizado em búfalos mantidos em pastos de *Brachiaria* spp. Através deste trabalho, objetivou-se padronizar a utilização da lectino-histoquímica na detecção de glicoconjugados nos tecidos de búfalos mantidos em diferentes pastos de *Brachiaria* spp no Brasil; verificar se há diferença de reatividade dos macrófagos espumosos às lectinas nas diferentes espécies de *Brachiaria* (*B. decumbens* e *B. brizantha*) e descrever, pela primeira vez, os achados lectino-histoquímicos em fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastos de *Brachiaria* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Intoxicação por plantas em búfalos no Brasil

Os relatos de intoxicação por plantas em búfalos no Brasil cresceram na última década, com descrições de intoxicação natural e experimental nas diferentes regiões do país. Em relação à *Brachiaria* spp, recentemente foram relatados dois surtos de fotossensibilização em búfalos associados à ingestão de *B. decumbens* no estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2013). Há, também, descrição de um surto de intoxicação por *B. humidicola* em búfalos com fotossensibilização no Amazonas (TOKARNIA & LANGENEGGER, 1983 apud RIET-CORREA et al., 2010) e um caso de intoxicação natural por *B. decumbens* em uma búfala no Rio Grande do Sul (ROZZA et al., 2004). Estão descritas, ainda, as lesões encontradas em fígado e linfonodo de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp no estado do Pará, sem sinais clínicos de fotossensibilização (RIET-CORREA et al., 2010). Estes dados demonstram que as lesões causadas por *Brachiaria* spp possuem relevante importância para a bubalinocultura do Brasil, de Norte a Sul do país.

2.2 Fotossensibilização

A fotossensibilização é um fenômeno que resulta em agressão à pele devido à ativação de pigmentos fotodinâmicos pela luz ultravioleta dos raios solares (McGAVIN; ZACHARY, 2007). Nos animais, a fotossensibilização é dividida em primária, secundária ou hepatógena e congênita.

A fotossensibilização primária pode ocorrer devido à ingestão e absorção de pigmentos vegetais, medicamentos intrinsecamente fotodinâmicos ou de substâncias como a fenotiazina (JONES, HUNT & KING, 2000). *Fagopyrum esculentum*, *Ammi majus* (TOKARNIA et al., 2012) e *Froelichia humboldtiana* (PIMENTEL et al., 2007) são plantas que já foram descritas como fotossensibilizantes primárias. Existe também a porfiria congênita, um distúrbio que envolve o fígado e resulta no metabolismo anormal da porção heme e culmina com o acúmulo e excreção anormal de porfirinas, que são fotodinâmicas (McGAVIN; ZACHARY, 2007).

Já a fotossensibilização de origem hepatógena está relacionada, principalmente, à ingestão de plantas do gênero *Brachiaria* spp e *Lantana* spp e à micotoxicose por *Pithomyces chartarum*, esta última rara no Brasil. Outras plantas como *Enterolobium contortisiliquum*, *Pterodon emarginatus*, *Stryphnodendron fissuratum* também tem sido associadas à fotossensibilização hepatógena (TOKARNIA et al., 2012). Devido à lesão hepática, há dificuldade na excreção normal de filioeritrina, um agente fotodinâmico produzido pela metabolização da clorofila, que se acumula em altas concentrações no sangue e tecido subcutâneo (McGAVIN; ZACHARY, 2007).

2.3 Intoxicação por *Brachiaria* spp

No Brasil, *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola* são as espécies que tem ocasionado casos de fotossensibilização (TOKARNIA et al., 2012). Desde 1985, autores têm sugerido que a toxicidade da *Brachiaria* se deve à presença de saponinas esteroidais litogênicas na gramínea (OPASINA, 1985; RIET-CORREA et al., 2011). A intoxicação por *Brachiaria* spp pode ocorrer em qualquer época do ano e sabe-se que ovinos, bovinos, caprinos, bubalinos e equinos podem ser susceptíveis à doença (TOKARNIA et al., 2012). Ovinos são mais sensíveis do que os bovinos (ALBERNAZ et al., 2010), assim como os

animais mais jovens são mais suscetíveis do que os adultos (RIET-CORREA et al., 2011). Em equinos, os casos de fotossensibilização são raros (BARBOSA et al., 2006).

As manifestações clínicas relacionadas às doenças fotossensibilizantes são variadas e as lesões cutâneas só ocorrem se a pele sensibilizada for exposta à luz solar, ou artificialmente, aos raios UV, e apresentam distribuição característica, sobretudo nas áreas despigmentadas (quando não cobertas por pelagem espessa ou lã) e nas partes mais expostas à luz solar (SEIXAS, 2009). As lesões mais graves em ruminantes são observadas nas regiões dorsais do corpo; as áreas mais lesadas são as orelhas, pálpebras, focinho, face, parte laterais das tetas e, em menor extensão, a vulva e o períneo (RADOSTITS et al., 2000). O primeiro sinal morfológico da fotossensibilização é o eritema cutâneo seguido de edema e exsudação serosa na superfície da pele. Nos casos graves, há necrose e ulceração; a pele lesada adquire um aspecto de “casca de árvore” e, muitas vezes, há desprendimento das partes afetadas (gangrena seca) (SEIXAS, 2009). Os animais apresentam sinais de anorexia, inquietação, fotofobia, prurido, formação de crostas e retração cicatricial auricular, icterícia e, por vezes, conjuntivite com secreção ocular e cegueira (LEMOS et al., 1996; LEMOS et al., 1998; BRUM et al., 2007; ALBERNAZ et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; SOUZA et al., 2010; RIET-CORREA et al., 2011).

As principais lesões macroscópicas que acometem os animais intoxicados com *Brachiaria* spp, além da dermatite necrótica, são variados graus de icterícia, aumento de volume e consistência do fígado, com evidencição do padrão lobular e coloração amarelada e vesícula biliar distendida (LEMOS et al., 1996; LEMOS et al., 1998; ALBERNAZ et al., 2010; SOUZA et al., 2010; SATURNINO et al., 2010). Nos casos de emagrecimento progressivo, a única lesão observada foi o fígado aumentado de volume e de coloração amarelada (SOUZA et al., 2010).

Histologicamente, os achados mais frequentes são tumefação ou necrose individual de hepatócitos, retenção biliar, colangite e pericolangite linfoplasmocitárias e, nos casos crônicos, variado grau de fibrose periportal (SOUZA et al., 2010; RIET-CORREA et al., 2011). Há, ainda, presença de macrófagos espumosos nos linfonodos e fígado, principalmente na região centrolobular, proliferação de vias biliares e cristais birrefringentes ou imagens negativas no interior dos ductos biliares ou no citoplasma de macrófagos (LEMOS et al., 1996; SOUZA et al., 2010; SATURNINO et al., 2010; ALBERNAZ et al., 2010). Na pele, pode-se observar acantose, hiperqueratose, incontinência pigmentaria nas áreas necróticas e ulceradas, formação de crostas, presença de infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, proliferação de pequenos vasos e deposição de colágeno na derme (LEMOS et al., 1996; BARBOSA et al., 2006). Em casos mais crônicos, observa-se dilatação de glândulas sudoríparas, proliferação vascular marcada e fibrose da derme (BARBOSA et al., 2006).

Concentrações de filoeitrina plasmática acima de 10 µg/dl são indícios de retenção biliar (STANNARD, 1993) e é comum observar elevação dos valores de bilirrubina e/ou ácidos biliares associada à fotossensibilização hepatógena (SEIXAS, 2009). Em adultos, a atividade sérica de enzimas de origem hepática como gama-glutamyltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), sorbitol-desidrogenase (SDH) e aspartatoaminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética (AST) são as mais úteis na identificação de doença hepática crônica. Nos estágios iniciais de doença hepática em bovinos, a SDH é o teste mais eficiente e sensível, porém nos casos crônicos pode não estar elevada devido a sua curta meia-vida. Assim, nos estágios tardios, a determinação da bilirrubina sérica e os testes da bromossulfaleína são mais indicados (SEIXAS, 2009). Nenhum desses testes é indicado para avaliar a função hepática de bezerros com menos de seis meses de idade; nesses casos é indicada a biópsia hepática (RADOSTITS et al., 2000).

Níveis de aminotransferases (AST e ALT) muito elevados sugerem hepatite aguda, mas elevações moderadas podem ser detectadas em diversas enfermidades hepáticas como

doenças hepatocelulares crônicas, cirrose, hepatopatias parasitárias e neoplasias (TENNANT, 1997). A natureza da doença hepática, se necrotizante ou colestática, pode ser determinada pela análise simultânea da atividade sérica das enzimas ALT e GGT, porém ruminantes apresentam pouca atividade hepática de ALT, a qual só poderá ser utilizada para avaliar o grau de necrose hepática, se não ocorrerem simultaneamente outras doenças não-hepáticas (SEIXAS, 2009). A avaliação da GGT tem grande vantagem para o diagnóstico de colestase em ruminantes, por ser uma enzima originária do tecido biliar hepático e seu aumento da atividade associa-se somente com colestase intra e extra-hepática e dano de ductos biliares (SEAWRIGHT et al., 1978; RAPOSO et al., 2004).

2.3.4 Intoxicação por *Brachiaria* spp em búfalos

Em bubalinos, está descrito um surto de intoxicação por *B. humidicola* no Amazonas, e as principais alterações encontradas no fígado foram necrose, tumefação e vacuolização de hepatócitos e presença de grande quantidade de macrófagos espumosos (TOKARNIA & LANGENEGGER, 1983 apud RIET-CORREA et al., 2010). No Rio Grande do Sul, há descrição de um caso de intoxicação por *B. decumbens* numa búfala em que observou-se, adicionalmente, proliferação de ductos biliares, bilestase e presença de cristais birrefringentes no interior dos macrófagos, hepatócitos e ductos biliares (ROZZA et al., 2004).

Em tecidos de bubalinos que morreram de diversas causas no estado do Pará, observou-se no fígado e linfonodos mesentéricos de todos os animais grande quantidade de macrófagos espumosos (RIET-CORREA et al., 2010). Foi diagnosticado um caso de intoxicação por *B. brizantha* em um bubalino que apresentava sinais de encefalopatia hepática, caracterizados por depressão acentuada, permanência em decúbito esternal, paralisia da mandíbula, língua e pálpebras e cegueira. À necropsia, observou-se fígado aumentado de tamanho, com bordos arredondados e acentuação do padrão lobular. Histologicamente o fígado apresentava grande quantidade de macrófagos espumosos distribuídos por todo o parênquima hepático, discreta proliferação de células de ductos biliares e fibrose na região periportal. Havia, também, vacuolização da substância branca no tronco encefálico (RIET-CORREA, 2009, dados não publicados).

No estudo de Riet-Correa et al. (2010) também notou-se que as lesões em fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp eram bem mais graves do que as observadas em bovinos, mas apesar de muitos animais apresentarem lesões hepáticas acentuadas, nenhum apresentava sinais clínicos de fotossensibilização. O fato de existirem poucos relatos de fotossensibilização em bubalinos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp indica que esta espécie, apesar de ser sensível à intoxicação por essas gramíneas, é aparentemente mais resistente à intoxicação do que os bovinos. Foi sugerido que a presença de lesões mais graves sem manifestação de sinais clínicos (evidenciado pelas lesões hepáticas) podem caracterizar os bubalinos como animais resilientes à intoxicação por *Brachiaria* spp e que possivelmente uma forma subclínica da doença pode ocasionar menor ganho de peso em búfalos, gerando perdas econômicas significativas (RIET-CORREA et al., 2010).

Em Minas Gerais, houve dois surtos de fotossensibilização em búfalos intoxicados por *B. decumbens* com quadro clínico-patológico similar aos relatados em ruminantes anteriormente, exceto pela ausência de icterícia, que é um sinal bastante frequente em bovinos, ovinos e caprinos (OLIVEIRA et al., 2013). Adicionalmente, não foi encontrado edema nas orelhas, ao redor dos olhos ou na mandíbula, assim como ceratite e cegueira, diferente dos achados de Albernaz et al (2010) em ovelhas intoxicadas por *B. brizantha*. Os sinais observados também foram semelhantes aos reportados em búfalos com fotossensibilização hepatógena devido à intoxicação por cobre (MINERVINO et al., 2010),

especialmente considerando as áreas afetadas, que foram principalmente os membros posteriores, cauda, pescoço e dorso. As lesões histológicas verificadas no fígado foram similares às encontradas em outros ruminantes que se alimentaram de *Brachiaria* spp, incluindo a presença de estase biliar, cristais nos ductos biliares, macrófagos espumosos e edema hepatocelular. Este achado confirma que a fotossensibilização em búfalos que ingerem *Brachiaria* spp está associada à deposição de material cristalóide nos ductos biliares e colestase. Este foi o primeiro relato de surtos de fotossensibilização em búfalos envolvendo um grande número de animais, e o estudo sugeriu uma possível correlação positiva entre o teor de saponinas e a quantidade de chuvas (OLIVEIRA et al., 2013).

2.4 Saponinas

Saponinas são metabólitos glicosilados secundários presentes em altas concentrações em plantas saudáveis. Esses metabólitos, que possuem potente ação antifúngica, são importantes no mecanismo de defesa das plantas e geralmente se tornam deficientes em algumas plantas modificadas geneticamente (PAPADOPOULOU et al., 1999). Estes glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos de elevada massa molecular ocorrem, de forma geral, como misturas complexas, devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares ou agliconas (BROOKS; LEATHEM; SCHUMACHER, 1997). A aglicona também é chamada de genina ou sapogenina (FLAOYEN; WILKINS; SANDVIK, 2002). Em sua estrutura, há uma parte lipofílica (triterpenoide ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares), o que resulta na propriedade característica deste grupo de compostos - promover saponificação - da qual deriva o seu nome (do latim *sapo* = sabão) (BROOKS; LEATHEM; SCHUMACHER, 1997). Elas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou pelo seu caráter ácido, básico ou neutro, denominando-se saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas. As saponinas esteroidais básicas ou alcalóidicas são encontradas principalmente no gênero *Solanum* e pertencem à família Solanaceae, enquanto que as triterpênicas estão presentes predominantemente nas dicotiledôneas (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004). Na gramínea *Panicum dichotomiflorum*, que causa fotossensibilização em ovinos, foram identificados isômeros 25R e 25S de protodioscina e metilprotodioscina, anteriormente isolados em *B. decumbens*, enquanto *P. maximum* cv. Tanzânia, cv. Monbaça, cv. Massai, cv. Áries e cv. Aruana apresentaram teores baixos destas saponinas (BURAKOVAS et al., 2007).

Devido ao comportamento anfifílico e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídeos de membrana, as saponinas possuem um variado número de propriedades biológicas, destacando-se a ação sobre membranas celulares, que altera a sua permeabilidade ou causa sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, frequentemente observam-se atividades hemolítica, ictiotóxica e molusquicida (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004). Verificou-se que a ingestão de saponinas influencia o desempenho e o metabolismo animal de diversas maneiras. Algumas alterações foram atribuídas às saponinas como: lise de eritrócitos, efeitos sobre os níveis de colesterol no sangue e no fígado, efeitos no crescimento, timpanismo nos ruminantes, inibição da atividade do músculo liso, inibição enzimática e efeitos sobre a absorção de nutrientes. A saponina reage com o colesterol na membrana do eritrócito, o que resulta em alterações na permeabilidade, podendo ser responsável pela atividade hemolítica. Porquinhos-da-índia, equinos, cães, ratos, coelhos, humanos, porcos, cabras, ovelhas e bovinos são, em ordem de susceptibilidade, os animais que podem sofrer com a atividade hemolítica da saponina (CHEEKE, 1971).

Saponinas disponíveis comercialmente podem ser esteroides, derivadas de *Yucca*, ou saponinas triterpenóides de *Quillaja*. Este último é obtido a partir de uma árvore sul

americana, *Quillaja saponaria*, e tem sido utilizado na pesquisa biológica (CHEEKE, 1971). Foi testado o efeito antifúngico de algumas saponinas esteroidais isoladas de diversas plantas monocotiledôneas. Demonstrou-se que as saponinas esteroidais C-27 devem ser consideradas como antifúngicos em potencial para mais estudos pré-clínicos e que essa atividade antifúngica não está relacionada com a citotoxicidade de células de mamíferos, uma vantagem quando comparada a algumas drogas antifúngicas utilizadas atualmente (YANG et al., 2006).

Saponinas esteroidais, yamogenina e diosgenina estão presentes em *B. decumbens* e seus metabólitos também foram identificados no rúmen e em cristais biliares de animais que ingerem a planta (SALAM ABDULLAH et al., 1992; SMITH; MILES, 1993). Esses metabólitos presentes nos cristais podem causar fotossensibilização hepatógena pelo bloqueio físico ao fluxo da bile ou podem ter uma específica ação colestática similar à do lantadeno A (SMITH; MILES, 1993).

Foram identificadas três zonas distintas de atividade metabólica no trato gastrointestinal a partir de experimentos com plantas que contêm saponinas (FLÅØYEN et al., 2001). Após a ingestão, há hidrólise e redução no rúmen, originando as saponinas livres tiogenina, esmilagenina, esmilagenona e epismilagenina. Parte destas saponinas sofrem epimerização a C-3 dis episapogeninas e são absorvidas no jejuno. As saponinas absorvidas no duodeno são transportadas através da veia porta ao fígado e as saponinas livres sofrem conjugação glicoronídea; no ceco e cólon ocorrem novas epimerizações (MEAGHER; SMITH; WILKINS, 2001). Após o metabolismo ruminal, há formação de cristais biliares (SMITH; MILES, 1993) que se acumulam em células hepáticas e ductos biliares (MILES et al., 1993, 1994). A metabolização das saponinas, em especial a diosgenina e a yamogenina, consiste na conversão em sais insolúveis de β -D-glicuronídeos (episarsasapogenina ou epismilagenina) (MILES et al., 1993, 1994; SMITH; MILES, 1993) na presença de cálcio ocorrem precipitação e formação de cristais biliares característicos (SMITH; MILES, 1993). Somente saponinas derivadas de 5β -espirostanóis diosgenina, epidiosgenina, yamogenina, epiyamogenina, esmilagenina, epismilagenina, sarsasapogenina e episarsasapogenina têm propriedades litogênicas, pois quando metabolizadas por ovinos, são transformadas em epismilagenina ou episarsasapogenina β -D-glicuronídeos. Essas transformações ocorrem no rúmen, com exceção da conjugação com o ácido glicurônico, que provavelmente ocorre no fígado (PATAMALAI et al., 1990; KELLERMAN et al., 2005).

2.4.1 Variação da concentração de saponinas em *Brachiaria* spp

A comparação entre diferentes estudos envolvendo a toxicidade da *Brachiaria* torna-se complicada devido à falta de padronização dos métodos de amostragem e às variações nos resultados, dependendo do tempo decorrido entre a colheita e a análise, mas existem evidências de que o teor de saponinas é inconstante ao longo do estágio de desenvolvimento das plantas. Quatro saponinas esteroidais e três sapogeninas já foram isoladas e identificadas das partes aéreas de *B. decumbens* (PIRES et al., 2002). Um estudo comparativo demonstrou que, em todos os momentos avaliados, a quantidade de saponina detectada na *B. decumbens* é significativamente maior do que na *B. brizantha* (LIMA et al., 2009). Adicionalmente, os resultados mostraram que, além da variação da saponina esteroideal protodioscina entre as espécies de *Brachiaria*, existe também diferença de concentração dentro da mesma espécie dependendo da idade da gramínea, com maior teor de saponinas durante a fase inicial do ciclo de vida da planta, assim como havia sido sugerido anteriormente (MEAGHER et al., 1996; SEN et al., 1998). Outros estudos corroboram com este dado ao relatar que as folhas secas contêm quatro vezes menos saponinas do que as folhas verdes (BARBOSA-FERREIRA et al., 2009) e que a concentração de protodioscina em folhas jovens é maior do que em folhas maduras ou velhas (FERREIRA et al., 2011). Em contraste, uma pesquisa constatou que os

teores da protodioscina tiveram níveis mais altos nos estágios finais de desenvolvimento de *B. brizantha* e *B. decumbens*, o que indica que a planta pode ser mais tóxica durante a fase de queda das sementes (BRUM et al., 2008); e outro estudo sugeriu que o hábito das ovelhas de selecionar folhas jovens não interfere na ocorrência da doença, pois a concentração de protodioscina foi a mesma nas folhas jovens, maduras e velhas (FACCIN et al., 2014). Além disso, foi relatado que há uma correlação negativa entre a concentração de saponinas e a precipitação total acumulada (FACCIN et al., 2014), resultado similar aos obtidos por Castro et al. (2011) e Lima et al. (2012), que sugerem que a idade da planta é a principal influência na concentração de saponinas, e não a precipitação.

Relata-se, também, variação dos níveis de saponina dentro da mesma pastagem de *B. decumbens* (BRUM et al., 2007). Sugere-se que o teor de saponinas pode variar dentro da mesma espécie quando as plantas são cultivadas em diferentes locais devido a fatores como estresse ambiental, idade da planta e estágio de desenvolvimento (OLESZEK, 2002). Recentemente foi estabelecida uma correlação positiva entre a quantidade de saponinas e a presença de folhas verdes na pastagem, assim como entre as saponinas e estação chuvosa em surtos de intoxicação por *B. decumbens* em búfalos (OLIVEIRA et al., 2013).

Um estudo demonstrou que, em amostras de *Brachiaria* como silagem ou feno, a concentração da saponina protodioscina é significativamente reduzida, sugerindo que animais de produção podem ter o risco de intoxicação reduzido ao consumir a planta derivada do processo de ensilagem ou fenação (LIMA et al., 2015). Além disso, outro estudo revelou que rebanhos de ovelhas podem incluir animais com diferentes graus de resistência à intoxicação por *Brachiaria* spp (FACCIN et al., 2014). Foi sugerido que ovelhas não adaptadas são mais susceptíveis à intoxicação do que animais que são criados na pastagem desde o nascimento, e que a seleção de animais resistentes deve ser utilizada como um método de controle, aumentando consideravelmente a resistência do rebanho (FACCIN et al., 2014; GRACINDO et al., 2014).

2.5 Lectinas

2.5.1 Estruturas e aspectos gerais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com um ou mais sítios de ligação por subunidade, que se unem reversivelmente a resíduos específicos de carboidratos (glicoproteínas, glicolipídeos e glicosaminoglicanos), e aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos ou glicoconjugados (GOLDSTEIN et al., 1980).

O termo lectina é derivado do verbo latino “*legere*”, que significa ligar, selecionar ou escolher, e refere-se à especificidade das lectinas em reconhecer e ligar-se a resíduos de carboidratos (BROOKS; LEATHEM; SCHUMACHER, 1997). Muitas lectinas se ligam não só a carboidratos, como também a outras moléculas complexas. Glicoproteínas secretadas e oligossacarídeos de superfície podem ser classificados em O-ligado e N-ligado de acordo com a natureza da sua ligação à proteína (DENNIS; GRANOVSKY; WARREN, 1999). Oligossacarídeos N-ligados (N-acetilglucosamina-asparagina) são covalentemente ligados à proteína através do nitrogênio da amida da asparagina, e os O-ligados (N-acetilgalactosamina-serina/treonina) são covalentemente ligados à proteína através do oxigênio da cadeia lateral da serina ou treonina. Em mamíferos, por exemplo, estudos sugerem que a síntese das estruturas N-ligado e O-ligado associadas a proteínas, juntamente com as porções glicosídicas de glicolipídeos, provavelmente podem ser explicadas por menos de 500 glicosiltransferases, específicas para cada tipo de ligação (DRICKAMER; WEIS; TAYLOR, 1998). As lectinas também podem ser subdivididas em integradas ou não integradas à membrana. Essa subdivisão provavelmente reflete a diferença fundamental nas funções gerais dessas classes.

As lectinas integradas à membrana parecem ter evoluído para se ligar aos glicoconjugados de membrana, quer seja na superfície da célula ou no interior de vesículas. Em contraste às lectinas solúveis, as não integradas à membrana podem se mover livremente dentro e entre as células, interagindo com glicoconjugados solúveis e ligados à membrana (BARONDES, 1984).

2.5.2 Aplicação das lectinas em diagnóstico

No diagnóstico patológico, o uso de lectino-histoquímica ainda é limitado, porém o conhecimento crescente sobre glicobiologia e glicopatologia faz com que se amplie sua aplicação nos estudos de tecidos normais e alterados. Lectinas reagem com resíduos de carboidratos de células eucarióticas e procarióticas e suas matrizes intercelulares, por isso podem marcar uma população celular particular. Em termos simples, as lectinas podem ser utilizadas em todas as situações nas quais anticorpos monoclonais e policlonais são comumente usados. Assim, podem ser empregadas para localizar resíduos e definir os tipos de carboidratos e a distribuição dos glicoconjugados em células adultas e embrionárias normais (DAMJANOV, 1987), além da importante utilidade nos estudos de alterações de crescimento e diferenciação celular e em neoplasias (HSU & REE, 1983).

As lectinas são utilizadas em tecidos neoplásicos para estabelecer, de acordo com a marcação, o prognóstico e potencial de metástase do tumor. Foi demonstrada a eficácia da utilização da lectina DBA juntamente com o anticorpo 4C9 para prognósticos de carcinomas de pulmão em humanos (MATSUMOTO et al., 1992). Neste estudo, pacientes com tumor de marcação negativa para 4C9 e marcação positiva para DBA, apresentaram poucas metástases e prognóstico significativamente melhor do que os pacientes com tumores que expressavam outros perfis de carboidratos. As lectinas *Griffonia simplicifolia* (GSL I) e *Phytolacca americana* (PWM) podem ser ferramentas importantes na diferenciação de carcinomas de células escamosas pouco diferenciados e outros tumores epiteliais pobremente diferenciados. Além das neoplasias, as lectinas podem ser utilizadas para detecção de fungo em secção de tecidos (DAMJANOV, 1988), como um complemento no diagnóstico da paratuberculose (MASSONE et al., 1991), e para identificar bactérias como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, entre outros (SLIFKIN; DOYLE, 1990). Algumas lectinas são específicas para identificar grupos sanguíneos em humanos (sistema ABO), para distinguir células cancerosas de células normais e para detectar substâncias intracelulares em doenças do armazenamento lisossomal (BROOKS; LEATHER; SCHUMACHER, 1997). As lectinas também têm sido utilizadas no diagnóstico da Doença de Crohn (MELO-JUNIOR et al., 2004), epididimite de carneiros, infecção por *Campylobacter* em vacas e *Trichomonas foetus* em ratas, bem como na detecção de diabetes mellitus. A técnica permite, ainda, a detecção de mineralização metastática incipiente na aorta de bovinos intoxicados por *Solanum malacoxylon* (BARBEITO; MASSONE; QUIROGA, 2005).

2.5.3 Uso das lectinas como marcadores tissulares

A lectino-histoquímica é mais específica que outras técnicas utilizadas para determinar carboidratos em tecidos animais, como o PAS (ácido periódico de Schiff) e o Alcian Blue (BROOKS; LEATHER; SCHUMACHER, 1997). Apesar de origens bastante heterogêneas, a partir de bactérias, plantas, células animais e tecidos, a maioria das lectinas utilizadas em laboratórios pode ser dividida em cinco grupos com base na sua ligação preferencial a açúcares: (1) grupo glucose/manose; (2) grupo N-acetilglucosamina; (3) grupo galactose/N-acetilgalactosamina; (4) grupo L-fucose e (5) grupo ácido siálico (DAMJANOV, 1987).

Os resultados em lectino-histoquímica se expressam de maneira semi-quantitativa. Em todos os casos, tenta-se graduar a intensidade da marcação observada utilizando-se quatro escores: negativa (-), discreta (+), moderada (++) e marcada (+++). Por outro lado, a especificação da localização da substância marcada dentro da célula é determinada por comparação. Por exemplo, se ocorrer na região perinuclear, estará associada ao aparelho de Golgi (BARBEITO; MASSONE; QUIROGA, 2005). É importante lembrar que a maioria das lectinas se une aos eritrócitos e ao endotélio vascular (o epitélio renal também se cora comumente). Por esse motivo é interessante sempre utilizar um controle negativo e um positivo (com animais da mesma espécie) (BARBEITO; MASSONE; QUIROGA, 2005).

A Tabela 1 sumariza algumas lectinas, suas fontes, seus açúcares específicos e exemplos de aplicação prática.

Tabela 1: Lectinas e propriedades específicas.

LECTINA	FONTE	ESPECIFICIDADE	APLICAÇÃO
Con A	Sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>	α Man, α Glc	Atividade semelhante à insulina
SBA	Sementes de <i>Glycine max</i> (aglutinina)	α > β GalNAc	Separação de células-tronco
WGA	<i>Triticum vulgare</i> (gérmen de trigo) (aglutinina)	GlcNAc	Purificação de receptores de insulina; liga-se a parede de células bacterianas; rastreamento neuronal
DBA	Sementes de <i>Dolichos biflorus</i> (aglutinina)	α GalNAc	Distingue células vermelhas A ₁ de A ₂ no sangue; liga-se a macrófagos pulmonares (ratos)
UEA I	Sementes de <i>Ulex europaeus</i> (aglutinina)	α Fuc	Marcador de células endoteliais (humanos)
RCA I	Sementes de <i>Ricinus communis</i> (aglutinina)	Gal	Rotulagem de receptores na brotação de neurônio (ratos)
PNA	Amendoim <i>Arachis hypogaea</i> (aglutinina)	Gal β 3GalNAc	Deteção de realocização do antígeno Tag em carcinoma de intestino
GSL I	Sementes de <i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>	α Gal, α GalNAc	Marcador de células endoteliais (camundongos)
PSA	Sementes de <i>Pisum sativum</i> (aglutinina)	α Man, α Glc	Separação de antígeno na leucemia linfoblástica em células de rim de felino; purificação de linfócitos T a partir de sangue periférico
LCA	Sementes de <i>Lens culinaris</i> (aglutinina)	α Man, α Glc	Não informado
PHA-E	Sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (eritroaglutinina)	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 (GlcNAc β 4) (GlcNAc β 4Man α 3) Man β 4	Se liga a células do sistema nervoso central (antígeno HNK-1)
PHA-L	Sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (leucoaglutinina)	Gal β 4GlcNAc β 6 (GlcNAc β 2Man α 3) Man α 3	Rastreamento neuronal; marcador de metástase tumoral
SJA	Sementes de <i>Sophora japonica</i> (aglutinina)	β GalNAc	Distingue entre tripanosomas patogênicos e não patogênicos
SWGA	<i>Triticum vulgare</i> succinilado (gérmen de trigo) (aglutinina)	GlcNAc	Ligação diferenciada nos vasos sanguíneos intrahepáticos

Adaptado de Vector Labs (2015). *Fuc = L-Fucose, Gal = D-Galactose, GalNAc = N-Acetilgalactosamina, Glc = D-Glucose, GlcNAc = N-Acetilglucosamina, Man = Manose.

2.6 Emprego das lectinas na detecção de substâncias nos tecidos

2.6.1 Uso das lectinas na detecção de saponinas

Saponinas esteroidais (metabólitos glicosilados) foram detectadas, através da lectino-histoquímica, em tecidos de bovinos que se alimentavam de pastos de *B. decumbens* e *B. brizantha* (GOMAR et al., 2005), e ovinos que se alimentavam de *Brachiaria* spp. (BOABAID et al., 2011), ambos sem fotossensibilização. No estudo realizado por Gomar et al. (2005) foram utilizados 100 bovinos adultos da raça Nelore, com idade de 3 a 4 anos, machos, castrados e provenientes do estado do Mato Grosso do Sul. Fragmentos de duodeno, fígado e linfonodos hepáticos e mesentéricos foram colhidos em matadouros e fixados em solução de formalina tamponada a 10%. Foram utilizadas sete lectinas, Con-A, SBA, DBA, UEA-I, WGA, PNA e RCA-I. As lectinas PNA, WGA e SBA foram as que melhor se ligaram com os macrófagos espumosos presentes nos casos de intoxicação por *B. decumbens* e *B. brizantha*, especialmente PNA, que mostrou marcada afinidade por macrófagos espumosos no fígado e linfonodos, em contraste com a baixa afinidade com as células restantes (GOMAR et al., 2005). Na pesquisa feita por Boabaid et al. (2011) o fígado e linfonodos hepáticos de 19 ovinos fêmeas, da raça Santa Inês, abatidos no estado do Mato Grosso, mantidos em pasto de *Brachiaria*, foram avaliados macroscopicamente, coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10%. Seções histológicas destes tecidos foram avaliadas pela técnica de lectino-histoquímica. As oito lectinas utilizadas foram Con-A, PNA, RCA, SBA, WGA, LCA, PHA-L e PSA (BOABAID et al., 2011). No fígado, as lectinas que coraram mais intensamente os macrófagos espumosos foram Con-A, RCA, WGA, LCA e PHA-L. A lectina PNA reagiu leve, porém especificamente com os macrófagos espumosos. Nos linfonodos, os macrófagos espumosos reagiram, principalmente, com as lectinas Con-A, LCA, PHA-L e PSA. A lectina PNA também obteve uma reatividade leve, mas específica com os macrófagos espumosos (BOABAID et al., 2011). Em outro estudo, desta vez realizado por Costa et al. (2013) com fragmentos de fígado e rim de 15 ovinos com fotossensibilização, mantidos em pastagem de *B. decumbens*, de ambos os sexos e idade variável, oriundos de Conceição do Mato Dentro, MG, foram avaliados pela técnica de lectino-histoquímica. Verificou-se que no fígado de ovinos com fotossensibilização provocada pela ingestão de *B. decumbens*, a lectina PNA apresentou acentuada reatividade aos macrófagos espumosos, bem como leve reatividade aos hepatócitos; as lectinas WGA, SBA, GSL I e LCA apresentaram moderada reatividade aos macrófagos espumosos do fígado e leve reatividade aos hepatócitos (COSTA et al., 2013).

2.6.2 Uso das lectinas na detecção de outras substâncias

A aplicação de lectino-histoquímica também tem sido realizada para o diagnóstico de doenças do armazenamento lisossomal (MURNAME; AHERN-RINDELL; PRIEUER, 1989). Há algum tempo, demonstrou-se a utilidade da lectino-histoquímica na detecção de substâncias complexas que contêm açúcar em tecidos animais relacionadas ou não com doenças do armazenamento como a lipidose (ALROY et al., 1986) e a manoseidose (ARMIÉN et al., 2007). A ingestão de plantas dos gêneros *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus* (causam uma enfermidade denominada de locoísmo em cavalos, bovinos e ovelhas intoxicados), *Ipomoea* e *Sida* (pode provocar α -manoseidose). A swainsonina (alcaloide indolizidina) inibe a enzima lisossomal α -manosidase e induz ao armazenamento de oligossacarídeos que contêm manose em lisossomos de muitas células, particularmente neurônios, hepatócitos e células acinares do pâncreas (DRIEMEIER et al., 2000). A swainsonina também inibe a manoseidase II do aparelho de Golgi, uma enzima chave na glicosilação de muitas glicoproteínas (TULSIANI; TOUSTER, 1983; STEGELMEIER et al., 1995).

Através da utilização da técnica de lectino-histoquímica, foi comprovado que a intoxicação por *Sida carpinifolia* em caprinos no Rio Grande do Sul é causada pelo armazenamento de manose ou de uma variedade de oligossacarídeos derivados da manose (DRIEMEIER et al., 2000). Neste estudo as lectinas *Concanavalia ensiformis* (CON-A), *Triticum vulgare* (WGA) e Succinil-WGA (sWGA) marcaram fortemente neurônios e células acinares pancreáticas vacuolizados. Também a partir da utilização de lectino-histoquímica, outros autores confirmaram doenças do armazenamento por glicolipídeos (lipidoses) em ovinos, associada à deficiência de β -galactosidase e α -neuraminidase (MURNAME; AHERN-RINDELL; PRIEUER, 1989), em cães, por deficiência de GM1-gangliosidose, e em camundongos, por galactosilceramide lipidose (ALROY et al., 1986). Nos ovinos, as lectinas PNA, RCA-I, DBA e SBA coraram o citoplasma dos neurônios do sistema nervoso central das ovelhas afetadas (MURNAME; AHERN-RINDELL; PRIEUER, 1989).

2.7 Vantagens comparativas do uso de lectinas em relação a outras técnicas

São inúmeras as vantagens do uso das lectinas comparativamente a outras técnicas, com destaque aos estudos bioquímicos de substâncias que, por sua natureza, não podem ser obtidas em forma pura e/ou em grandes volumes, colocando ao alcance do patologista, com um mínimo de conhecimento de bioquímica e equipamentos, um método de alta sensibilidade e especificidade. A disponibilidade de kits comerciais de lectinas, altamente purificadas e de composição química uniforme, diminui custos e facilita a uniformização dos métodos clássicos. Os sítios de união das lectinas com os resíduos de carboidratos não têm interação entre si, obtendo-se, assim, resultados mais confiáveis. Os receptores de lectinas resistem bem ao tratamento com os fixadores convencionais; porém, a fixação com Carnoy e corte por congelamento oferecem melhores resultados. Os tecidos incluídos em parafina ou embebidos em resinas plásticas para estudo em microscópio eletrônico podem ser examinados através desta técnica, o que permite a realização de estudos retrospectivos. As lectinas têm maior especificidade que os métodos histoquímicos clássicos utilizados na demonstração de carboidratos. Os glicoconjugados identificados por meio de técnicas de lectino-histoquímica podem ser isolados e purificados mediante cromatografia por placas ou colunas seletivas (BARBEITO; MASSONE; QUIROGA, 2005).

As análises histopatológicas e ultraestruturais convencionais de tecidos animais, geralmente, servem para a detecção de doença do armazenamento lisossomal, mas não para o diagnóstico mais específico (USHIYAMA et al., 1985; DRIEMEIER et al., 2000). Ademais, o emprego da técnica de lectino-histoquímica evita o tempo despendido na amplificação *in vitro* em cultivo celular e requer unicamente o equipamento utilizado no processamento rotineiro de tecidos para histopatologia (MURNAME; AHERN-RINDELL; PRIEUER, 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os estudos foram realizados no Laboratório de Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica, localizado no Anexo I do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica – RJ.

3.2 Amostras de tecidos

O exame lectino-histoquímico foi realizado em fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico, previamente fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina, de 40 búfalos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, sexo não informado, sem sinais clínicos de fotossensibilização, provenientes do estudo desenvolvido por Riet-Correa et al. (2010) (Anexo A). Desses animais, 10 búfalos, com idade entre 24 e 30 meses, foram mantidos em pastagem predominante de *B. decumbens* por aproximadamente 12 meses, em uma propriedade localizada no município de Ourém, PA; 10 búfalos, com idade não informada, foram mantidos em pastagem com predominância de *B. brizantha* por aproximadamente 18 meses, em propriedade localizada no município de Paragominas, PA; e 10 búfalos com idade entre três e quatro anos, provenientes do município de Rondon do Pará, PA, foram criados desde o nascimento em uma propriedade que utilizava somente *B. brizantha* na alimentação. Como controle negativo, foram utilizados fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de outros 10 búfalos, de três a quatro anos de idade, provenientes da Ilha de Marajó, PA, e mantidos em pastagem de campo nativo, livre de *Brachiaria* spp desde o nascimento. A **Figura 1** representa o mapa dos municípios do estado do Pará, com destaque para as regiões de origem dos animais do presente estudo.

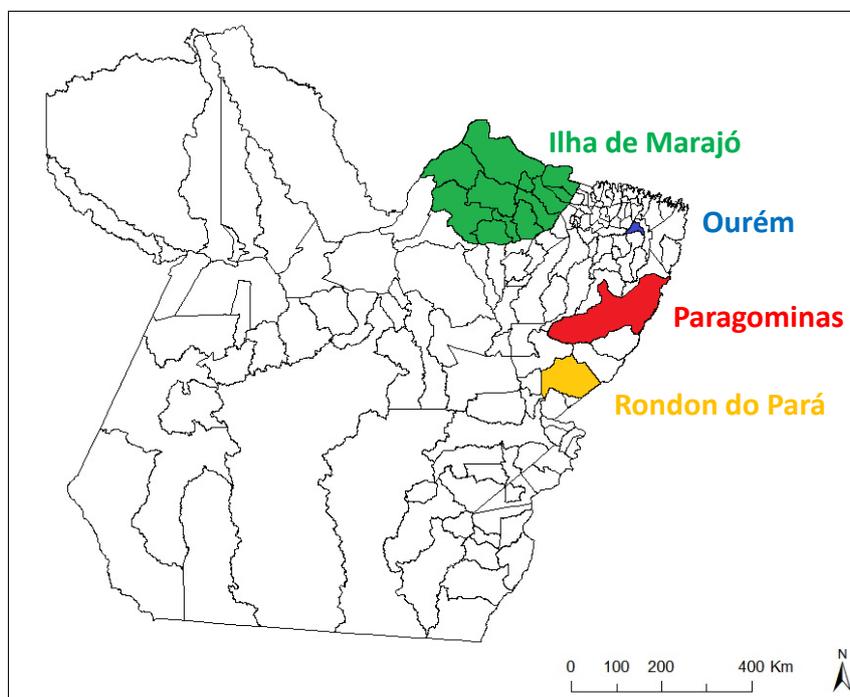


Figura 1. Adaptado de IBGE: mapa dos municípios do estado do Pará. Ilha de Marajó (verde): grupo controle negativo; Ourém (azul): búfalos mantidos em *B. decumbens* por aproximadamente 12 meses; Paragominas (vermelho): búfalos mantidos em *B. brizantha* por aproximadamente 18 meses; Rondon do Pará: búfalos mantidos em *B. brizantha* por aproximadamente quatro anos.

3.3 Lectinas

Foram utilizadas as lectinas *Canavalia ensiformis* agglutinin (**Con-A**; a-d-Man; a-d-Glc-specific), *Dolichos biflorus* agglutinin (**DBA**; a-d-Gal-Nac-specific), *Glycine max* agglutinin (**SBA**; a-d-GalNac; b-Gal-specific), *Arachis hypogaea* agglutinin (**PNA**; b-d-Gal/(1-3)GalNac-specific), *Ricinus communis* agglutinin-I (**RCA-I**; b-d-Gal-specific), *Ulex europaeus* agglutinin-I (**UEA-I**; a-L-Fuc-specific), *Triticum vulgare* agglutinin (**WGA**; a-d-GlcNac/NeuNac-specific, Succinyl-WGA (**sWGA**), *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* (**GSL**), *Sophora japonica* (**SJA**), *Pisum sativum* (**PSA**), *Phaseolus vulgaris* (**PHA-L e PHA-E**), *Lens culinaris* ou *L. esculenta* (**LCA**) (Lectin Kit Biotinylated BK 1000 e 2000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, 94010, USA). Seções histológicas cortadas a 5 µm de espessura de fígado e linfonodo mesentérico foram fixadas em lâminas silanizadas, desparafinadas em xilol, hidratadas em álcool e incubadas em duas soluções de peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos cada, para bloqueio de peroxidases endógenas. Após a lavagem das lâminas por dois minutos com tampão fosfato (PBS), estas ficaram submersas em tampão citrato (pH 6,0) para recuperação antigênica, por 30 minutos em banho-maria a 98°C. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 5% (Molico® - Indústria Brasileira) por 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” com lectinas na diluição de 5 µg/mL em PBS, com exceção da lectina Con-A (1,0 µg/mL) e RCA-I (0,5 µg/mL). Posteriormente, as amostras foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc.) por 20 minutos. Todas as seções foram coradas com o cromógeno DAB, contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas para avaliação em microscópio óptico.

3.4 Avaliação das lâminas

Cada uma das 14 lectinas foi testada em dois fragmentos (fígado e linfonodo mesentérico) de 40 búfalos, totalizando 1120 fragmentos avaliados. A marcação lectino-histoquímica foi graduada como leve (+), moderada (++) ou acentuada (+++), de acordo com a intensidade da reatividade de ligação das lectinas. As seções foram analisadas em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E200), sempre comparadas aos controles negativos (búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp), e registros de fotomicrografia foram realizados com câmera própria para microscópios (Moticam 2500 5.0 megapixels) e capturada pelo software Motic Cam 2.0.

Após a análise dos resultados, os mesmos foram resumidos em tabelas individuais de acordo com a média da intensidade de reação das lectinas em cada uma das estruturas avaliadas (macrófagos, membrana de hepatócitos, grânulos citoplasmáticos de hepatócitos, ductos biliares, células de Kupffer, capilares sinusoides, endotélio, plasmócitos, neutrófilos e células da região centro-folicular). A porcentagem foi calculada em função da quantidade de fragmentos que apresentou marcação para estas estruturas. Este cálculo pode ser exemplificado pela avaliação da reatividade em hepatócitos e ductos biliares, onde a fração total corresponde a 10 fragmentos de fígado de cada grupo (pois estas estruturas estão presentes apenas no tecido hepático), ou pela avaliação da reatividade em células inflamatórias, onde a fração total corresponde a 20 fragmentos de cada grupo, sendo 10 de fígado e 10 de linfonodo mesentérico (pois células inflamatórias estão presentes em ambos os tecidos). Quando necessário, a porcentagem dos fragmentos foi arredondada para o número mais próximo, sempre em intervalos de 10 pontos percentuais.

4 RESULTADOS

Os resultados da avaliação lectino-histoquímica em fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em diferentes pastos de *Brachiaria* spp e no grupo controle estão sumarizados nos **Quadros 1-4**. A análise lectino-histoquímica revelou que a lectina SWGA apresentou acentuada reatividade e alta especificidade para macrófagos espumosos do fígado e linfonodo mesentérico de todos os animais mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp (**Figuras 2-5**); enquanto as lectinas WGA (**Figuras 6 e 7**), GSL (**Figuras 8 e 9**), PHA-E (**Figuras 10 e 11**) e PHA-L (**Figuras 12 e 13**) apresentaram moderada a acentuada reatividade aos macrófagos espumosos e leve a moderada reatividade aos hepatócitos e células inflamatórias. No grupo controle, as lectinas WGA, GSL, PHA-E e PHA-L apresentaram de leve a moderada reatividade aos hepatócitos e células inflamatórias. As demais lectinas não apresentaram reatividade ou especificidade significativas. O resumo dos resultados da avaliação lectino-histoquímica estão ilustrados nas **Tabelas 2-15**. Além disso, observou-se que a presença de macrófagos espumosos e a reatividade de ligação lectino-histoquímica foi significativamente menor nos búfalos que se alimentaram em pastos de *B. brizantha* durante quatro anos, comparada aos animais que ingeriram *B. brizantha* por 18 meses. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas de reatividade ou especificidade nos cortes histológicos entre os búfalos que foram mantidos em pastagens de *B. decumbens* por 12 meses e *B. brizantha* por 18 meses.

Quadro 1. Resultados da avaliação lectino-histoquímica em fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos livres de pastagem de *Brachiaria* spp.

ID	Con A	SBA	WGA	DBA	UEA I	RCA ₁₂₀	PNA
3612 Fígado	MH + GC +	K +	MH + GC + K (+) E (+) N + DB +	P +++ N +++	-	MH + GC + K ++ S ++	K + N +
3612 Linfonodo	CF +	CF +	CF +	P +++ N +++	CF ++	CF ++	CF ++
3584 Fígado	GC +	-	MH (+) GC + K + S +	P +++ N +++	-	MH + GC (+) K + S +	-
3584 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	-	-	-
3607 Fígado	GC +	-	S +	P +++ N +++	K ++	-	-
3607 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	P + N +	-	-
3589 Fígado	GC +	-	-	P +++ N +++	P + N +	-	-
3589 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	-	-	-
3547 Fígado	GC +	-	GC + E + S +	P +++ N +++	-	-	-
3547 Linfonodo	-	-	CF (+)	P +++ N +++	CF +	-	CF (+)
3596 Fígado	GC +(+))	-	GC +(+)) MH + E +	P +++ N +++	DB +++	-	-
3596 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	-	-	-
3586 Fígado	GC (+)	-	GC + MH + E +	P +++ N +++	-	-	-
3586 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	CF ++	-	-
3551 Fígado	GC (+)	-	MH (+) GC (+)	P +++ N +++	DB +++	-	-
3551 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	CF ++	-	-
3604 Fígado	-	-	MH (+) GC +	P +++ N +++	-	-	-
3604 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	-	-	-
3597 Fígado	-	-	GC +(+)) MH + E +	P +++ N +++	-	-	-
3597 Linfonodo	-	-	-	P +++ N +++	CF +	-	-

MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 1. Resultados da avaliação lectino-histoquímica em fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos livres de pastagem de *Brachiaria* spp (continuação).

ID	GSL I	PSA	LCA	PHA-E	PHA-L	SJA	SWGA
3612 Fígado	GC + K ++ S ++ DB +	GC + K + S +	MH + GC +	GC + K ++ S ++	K ++ S ++	-	-
3612 Linfonodo	CF (+)	CF +	CF (+)	CF +	CF +		
3584 Fígado	GC + K + S +	GC + K ++ S ++	MH + GC + K ++ S ++	K ++ S ++	K ++ S ++	-	-
3584 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-
3607 Fígado	K +++ E + N +	K ++	GC + K ++ S +	GC + K ++ S +	GC + K ++ S +	-	-
3607 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-
3589 Fígado	-	-	-	-	-	-	-
3589 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-
3547 Fígado	S ++ E ++	MH + GC + S +	MH + GC + K + S +++	GC + K ++ S + DB +	GC + K ++ S + DB +	-	-
3547 Linfonodo	-	CF (+)	-	-	-	-	-
3596 Fígado	S ++ K ++	MH + GC + S + K +	MH + GC + S +(+)	MH ++ GC + S +	GC + K ++ S + DB ++	-	-
3596 Linfonodo	-	-	-			-	-
3586 Fígado	S ++ K ++ E ++	GC + MH (+) E + K (+)	MH + GC (+) S +++ K ++	MH +(+) GC + S +	MH + S ++ E ++ K +	-	-
3586 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-
3551 Fígado	S ++ K ++ E +	GC + S +(+) K +	MH + S + K +	MH + S + K +	MH + S + K +	-	-
3551 Linfonodo	CF ++	CF +	-	-	-	-	-
3604 Fígado	GC + K + S +	MH + GC + S +	GC + K ++ S +	MH + GC + K +	GC + K ++ S +	-	-
3604 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-
3597 Fígado	S ++ E ++	GC + E + K (+)	MH (+) GC + K +	MH +(+) GC (+) S +	MH + S + K (+)	-	-
3597 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-

MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 2. Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens* por aproximadamente 12 meses.

ID	Con A	SBA	WGA	DBA	UEA I	RCA ₁₂₀	PNA
7-24 Fígado	M ++ MH + GC + DB +	M + K ++ E + N +	M ++(+) MH + GC + S + DB +	N ++	K +	M ++ MH ++ GC ++ K ++ E ++	K +
7-24 Linfonodo	M + CF +	M ++ P ++ E ++	M +++ CF +	N ++ P ++	M +++ P ++	M ++ CF ++ P ++	CF ++
9-24 Fígado	M + GC +	-	M ++(+) MH (+) GC (+) S (+) DB +	N ++ P ++	-	-	-
9-24 Linfonodo	M +	-	M +++ CF +	N ++ P ++	M ++ CF +	-	-
11-24 Fígado	GC +	-	M +++ S + DB +	N ++ P ++	-	-	-
11-24 Linfonodo	M +	-	M +++	N ++ P ++	M +	-	-
24-24 Fígado	-	-	M +++ MH (+) GC (+) S (+) DB (+)	N ++ P ++	-	-	-
24-24 Linfonodo	M (+)	-	M +++	N ++ P ++	M +	-	-
6-24 Fígado	-	-	M ++ MH (+) GC (+) S (+) DB (+)	N ++ P ++	-	K +	-
6-24 Linfonodo	-	-	M ++(+)	N ++ P ++	M +	-	-
20-24 Fígado	MH + GC +	-	MH (+) GC (+) S (+)	N ++ P ++	-	S + K +	-
20-24 Linfonodo	CF +	-	M ++ CF +	N ++ P ++	M +++	-	-
10-24 Fígado	MH + GC +	-	M +++ MH + GC +	N ++ P ++	-	M ++ MH + GC +	-
10-24 Linfonodo	M +	-	M +++	N ++ P ++	CF ++ M +	-	-
8-24 Fígado	MH + GC +	-	M +++ MH ++(+) GC ++(+)	N +++ P +++	-	M (+) K ++ MH +	-
8-24 Linfonodo	M ++(+)	-	M +++	N +++ P +++	CF ++ M (+)	-	-
12-24 Fígado	GC (+)	-	M ++(+) MH + GC + S (+)	N +++ P +++	K +	K +	-
12-24 Linfonodo	M (+)	-	M (+)	N +++ P +++	-	-	-
22-24 Fígado	GC (+)	-	M ++ MH + GC (+)	N +++ P +++	K +	K + N +	-
22-24 Linfonodo	M (+)	-	M (+)	N +++ P +++	CF +	-	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 2. Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens* por aproximadamente 12 meses (continuação).

ID	GSL I	PSA	LCA	PHA-E	PHA-L	SJA	SWGA
7-24 Fígado	M ++ GC + K + S + DB ++	M + MH + GC + K +	M + MH + GC + K +	M ++ MH + GC + K + E +	M ++ MH + GC + S ++ E +	-	M ++
7-24 Linfonodo	M ++ N + CF +	M + CF +	M (+) CF +	M + CF +	M + CF +	M +	M +(+)
9-24 Fígado	M ++ K +	MH + GC + K + S +	MH + GC + K + S ++	M +++ MH + GC + K +	M +++ MH + GC + S +	-	M +
9-24 Linfonodo	M + CF (+)	CF +++	CF ++	CF +++	M +++ CF ++	-	M +
11-24 Fígado	M ++ K +	M + K + S +	M (+) GC (+) K +	M ++ GC + S +	M +++ K + S +	-	M +++
11-24 Linfonodo	M (+)	CF ++	CF ++	M + CF +	M +	-	M +++
24-24 Fígado	M +++ K + E +	M + K + S +	M + GC + K +	M ++ GC + K +	M ++ K + S +	-	M +++
24-24 Linfonodo	M +	CF +	CF +	M ++	M ++ K +	-	M +++
6-24 Fígado	M ++ K + E + N +	MH + GC + K + S +	MH + GC + K + S +	M ++ GC + K + S +	M +(+) GC + K + S +	-	M +++
6-24 Linfonodo	M (+)	M (+)	-	M (+) CF +	M (+) CF +	-	M ++
20-24 Fígado	DB + K + E + N +	MH + GC + K + S ++	-	MH + GC + K + S +	MH + GC + K + S +	-	M +
20-24 Linfonodo	M (+) CF ++	CF +	-	-	M (+)	-	M ++
10-24 Fígado	M (+) DB + K + E +	MH + GC + K + S +	M + MH (+) GC (+)	MH + GC + K + S +	M ++ GC + K + S +	-	M +++
10-24 Linfonodo	-	CF +	-	CF +	M + CF +	-	M +++
8-24 Fígado	M +++ K ++ E ++ DB +	GC +(+)	M + MH + GC +	M +(+) GC + MH + K +	M + GC + MH + S +	-	M +++
8-24 Linfonodo	M +++ CF +	CF +	CF +	M (+)	M (+)	-	M +++
12-24 Fígado	M ++ K ++ S ++ E ++	M + CG + K + E +	M + GC (+) S + K +	M + MH + K + S +	M + GC (+) MH + K +	-	M +
12-24 Linfonodo	-	-	-	M (+) CF +	M (+) CF +	-	M (+)
22-24 Fígado	M ++ GC (+) K ++ E +	GC + K + E +	GC + S + K +	M ++ GC + MH + K +	M + GC + S + K +	-	M ++
22-24 Linfonodo	M (+) CF +	-	CF ++	M + CF +	M + CF +	-	M +++

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 3. Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha* por aproximadamente 18 meses.

ID	Con A	SBA	WGA	DBA	UEA I	RCA ₁₂₀	PNA
14-17 Fígado	M + MH + GC +	M ++ K ++ E +	M ++ MH + GC + S +	N ++	K (+)	M ++ MH ++ GC + K ++ E ++	K ++ N ++
14-17 Linfonodo	M + CF +	M ++ P ++	M +++	M +(+) N ++ P +	M ++ P ++	M ++ F ++ P ++	F +
17-17 Fígado	M ++ G ++	-	M ++ MH + GC + S ++	N ++ P ++	-	-	-
17-17 Linfonodo	M + CF +	-	M ++(+)	N ++ P ++	M ++ P ++	-	-
12-17 Fígado	GC ++	-	M +++ MH + GC +	N +++ P +++	-	-	-
12-17 Linfonodo	M +(+)	-	M +(+)	N +++ P +++	M ++ F ++ P ++	-	-
3-17 Fígado	GC +	-	M +++ MH + GC +	N +++ P +++	-	-	-
3-17 Linfonodo	M + CF +	-	M ++(+)	N +++ P +++	M ++	-	-
10-17 Fígado	M + MH (+) GC (+)	-	M +++ MH + GC +	N +++ P +++	-	M +	-
10-17 Linfonodo	-	-	M +++	N +++ P +++	M +	-	-
16-17 Fígado	M + MH + GC +	-	M ++ MH + GC +	N +++ P +++	-	-	-
16-17 Linfonodo	M + CF +	-	M ++	N +++ P +++	M +	-	-
11-17 Fígado	MH + GC +	-	M +++	N +++ P +++	-	M +	-
11-17 Linfonodo	CF +	-	M +++	N +++ P +++	M + CF ++	CF +	-
9-17 Fígado	M + GC +	-	M ++(+) GC + MH + S +	N +++ P +++	DB ++	M + K +	-
9-17 Linfonodo	M + CF +	-	M +(+)	N +++ P +++	CF ++	-	-
2-17 Fígado	M +(+) GC +(+)	-	M ++ GC + MH + S +	N +++ P +++	-	-	-
2-17 Linfonodo	M + CF +	-	M +	N +++ P +++	M ++	-	-
13-17 Fígado	M (+) GC (+)	-	M ++ GC (+) MH (+)	N +++ P +++	-	K ++	-
13-17 Linfonodo	M (+) CF (+)	-	M ++	N +++ P +++	M +	-	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 3. Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha* por aproximadamente 18 meses (continuação).

ID	GSL I	PSA	LCA	PHA-E	PHA-L	SJA	SWGA
14-17 Fígado	M +++ GC + K + N + E ++	M +(+) MH + GC + K +	M + MH + GC +	M ++ MH + GC +	M +++ M ++ GC + K ++ S ++	-	M +++
14-17 Linfonodo	M +(+) CF +	M + CF +	M (+) CF +	M + CF +	M ++ CF ++	-	M +++
17-17 Fígado	M +++ K +++ N ++ E +	GC + S ++ K +	M (+) GC + K + S +	M ++ K + S ++	M ++ K ++ S ++	-	M +
17-17 Linfonodo	M +	CF ++	CF ++	M +(+) CF +	M ++ CF +	-	M +
12-17 Fígado	M +++ K +++ E ++	M + K + S +	M + K + S +	M ++ K + S +	M +++ K + S +	-	M ++
12-17 Linfonodo	M +++ P ++	M (+) P +	M (+) CF +	M +(+) CF +	M +(+) CF +	-	M ++
3-17 Fígado	M ++ GC (+) K ++	GC + K + S +	GC + K + S +	M + K + S +	M + K + S +	-	M ++
3-17 Linfonodo	M (+)	-	-	-	M (+)	-	M ++
10-17 Fígado	M +++ K ++ E ++	GC + K ++ S ++	M (+) GC + K + S +	M +(+) MH + GC + S +	M +(+) MH + GC + K +	-	M +++
10-17 Linfonodo	M (+)	-	-	-	-	-	M ++
16-17 Fígado	M +++ K +++ N ++	GC + K ++ S ++	GC +	M + MH + GC +	M (+) MH (+) GC (+)	-	M +++
16-17 Linfonodo	M (+)	-	CF +	-	-	-	M +++
11-17 Fígado	M +++ K +++ GC + MH + N ++	M ++ GC + MH + S + E +	M + MH ++ GC + K + S +	M +(+) MH + GC + K + S +	M +++ MH (+) GC (+) K ++ S (+)	-	M +++
11-17 Linfonodo	-	-	M + CF ++	CF +	-	-	M +++
9-17 Fígado	M ++(+) GC ++ K ++ E ++	M + GC (+) E +	M +(+) GC + K +	M ++ GC + MH + S +	M +(+) GC + MH + K +	-	M +++
9-17 Linfonodo	M + CF +	CF +	CF +	M + CF +	M + CF +	-	M ++
2-17 Fígado	M +(+) GC + S + E +	GC + MH + K + S +	M + GC + S +	M ++ GC + MH + S +	M +(+) GC (+) MH (+) K +	-	M +++
2-17 Linfonodo	M + CF +	CF +	CF +	M + CF +	M + CF +	-	M +++
13-17 Fígado	M ++ K ++ S ++	M + GC + MH + K + S +	M + GC + MH + K + S +	M +(+) GC + MH + S + K +	M (+) GC (+) MH (+) S (+) K (+)	-	M +++
13-17 Linfonodo	M (+) CF (+)	CF +	-	M (+) CF (+)	M (+) CF (+)	-	M ++

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 4. Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha* por aproximadamente 4 anos.

ID	Con A	SBA	WGA	DBA	UEA I	RCA ₁₂₀	PNA
16-28 Fígado	M ++ MH + GC + DB +	K ++ G + DB ++ N +	M + MH + GC + E + N + DB +	GC ++ DB ++ N ++	GC + DB ++	MH + GC + S +	GC (+) DB + E + K + N +
16-28 Linfonodo	M + CF +	P ++ E ++	-	M + CF +++ N ++	CF (+)	M + CF +	P ++
18-28 Fígado	M ++ MH (+) GC +	-	M + MH + GC + E + N + DB ++	N ++ P ++	DB +++	-	-
18-28 Linfonodo	M + CF +	-	M ++ E +	-	-	M (+)	-
21-28 Fígado	GC +	-	MH + GC +	N ++ P ++	-	-	-
21-28 Linfonodo	M ++ CF +	-	M ++ E ++	P +++ N +++	P + N +	-	-
25-28 Fígado	M + GC +	-	MH + GC + K ++ E + DB +	P +++ N +++	-	-	-
25-28 Linfonodo	M (+)	-	M + E ++	P +++ N +++	P + N +	-	-
23-28 Fígado	-	-	MH + GC + K + N +	P +++ N +++	-	MH + GC + S ++	-
23-28 Linfonodo	-	-	CF +	P +++ N +++	P + N +	-	-
17-28 Fígado	M + MH (+) GC (+)	-	MH + GC + K + N +	P +++ N +++	DB +++	K ++ MH + GC +	-
17-28 Linfonodo	M (+)	-	-	P +++ N +++	CF ++ P +++ N +	-	-
26-28 Fígado	MH + GC +	-	MH + GC + K +	-	-	-	-
26-28 Linfonodo	M +	-	M ++	CF ++	-	-	-
24-28 Fígado	GC +	-	DB +++ S ++ E ++	P +++ N +++	DB +++	S + K ++ E +	GC + K ++ E ++
24-28 Linfonodo	M +	-	M +++	P +++ N +++	-	-	P +++ CF +++
22-28 Fígado	GC +	-	DB + GC + MH ++	P +++ N +++	DB +++	K +	-
22-28 Linfonodo	M (+)	-	M +(+))	P +++ N +++	CF +++	M (+)	P +++
19-28 Fígado	GC ++	-	-	P +++ N +++	-	K +	-
19-28 Linfonodo	M +	-	M ++	-	CF +++	CF +	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Quadro 4. Resultados da avaliação lectino-histoquímica de fragmentos de fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha* por aproximadamente 4 anos (continuação).

ID	GSL I	PSA	LCA	PHA-E	PHA-L	SJA	SWGA
16-28 Fígado	M + GC + K ++ S ++	GC + K +	GC +	MH + GC +	MH + GC + DB ++ S ++	GC (+)	G + DB ++
16-28 Linfonodo	M + CF ++	M + CF +	M + CF +	M + CF +	M + CF +	CF (+)	N + M ++
18-28 Fígado	GC + K ++ S ++ N +	MH + GC + S +++ K ++	MH + GC + S +++ K ++	MH + S ++ K ++ DB ++	S ++ K ++ DB ++	-	DB +
18-28 Linfonodo	M + CF +	M ++ CF +	M ++ CF +	M ++ CF +	M ++ CF +	-	M +
21-28 Fígado	GC (+) K ++ E + N +	GC + S ++ K ++	GC + S ++ K ++	GC + S ++ K ++	S +++ K ++ DB ++ E ++	-	-
21-28 Linfonodo	CF +	M +++ CF +	M +++ CF +	M + CF +	M + CF +	-	M +
25-28 Fígado	GC + K ++ S ++ N +	MH + GC + S ++ K ++	MH + GC + S ++ K ++	MH + GC + S ++ K ++	S ++ K ++ DB ++ E ++	-	-
25-28 Linfonodo	CF +	CF +	CF +	CF +	CF +	-	-
23-28 Fígado	GC + K ++ S ++	GC + K ++ N +	GC + S + K ++	MH + GC + K +	S ++ K ++ E ++	-	-
23-28 Linfonodo	CF +	CF +	CF +	CF +	CF +	-	M +
17-28 Fígado	GC (+) K +++ S ++ E + N +	GC (+) K ++ S ++ E + N +	GC + S + K +	MH + GC + S + K +	S ++ K ++ K + DB ++ E ++	-	-
17-28 Linfonodo	-	-	-	-	-	-	-
26-28 Fígado	MH + GC ++ S + K ++(+)	MH (+) K ++ S + E +	GC (+) S + K +	MH + GC (+) S ++ E +	DB + E + S + MH +	-	DB ++
26-28 Linfonodo	CF +	-	CF +	-	-	-	-
24-28 Fígado	GC + MH + K ++	GC + MH + K ++(+) E +	M + GC ++(+) MH + S ++	GC + MH + S ++(+) K +	MH + S ++ E +	-	DB ++
24-28 Linfonodo	-	M ++	M +	M (+)	M (+)	-	M +++
22-28 Fígado	M +++ K ++ S +++ E ++	GC + MH + S ++ K +	GC (+) MH + K +	GC + MH ++ K +	MH ++ GC + S + K +	-	-
22-28 Linfonodo	CF ++ M (+)	M ++(+)	M +	M + CF +	M + CF +	-	M +++
19-28 Fígado	-	GC + MH + S + K +	-	M (+) MH + S ++ E ++	M (+) GC ++ S ++ E ++	-	-
19-28 Linfonodo	-	CF +	-	-	M (+)	-	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 2. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina Con A no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	Con A									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle		+	+							+
Negativo	-	10%	70%	-	-	-	-	-	-	10%
<i>B. decumbens</i>	+	+	+	+						+
(12 meses)	50%	40%	80%	10%	-	-	-	-	-	20%
<i>B. brizantha</i>	+	+	+/++	-	-	-	-	-	-	+
(18 meses)	70%	40%	90%							80%
<i>B. brizantha</i>	+	+	+/++	+	-	-	-	-	-	+
(4 anos)	60%	40%	90%	10%						30%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 3. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina SBA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	SBA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle					+					+
Negativo	-	-	-	-	10%	-	-	-	-	10%
<i>B. decumbens</i>	+	-	-	-	++		+	++	+	-
(12 meses)	10%				10%	-	10%	10%	10%	-
<i>B. brizantha</i>	++	-	-	-	-	-	+	++	-	-
(18 meses)	10%						10%	10%		-
<i>B. brizantha</i>	-	-	-	++	++	-	++	++	+	-
(4 anos)				10%	10%		10%	10%	10%	

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 4. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina WGA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	WGA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle		+	+	+	+	+	+			+
Negativo	-	70%	80%	10%	20%	30%	50%	-	-	20%
<i>B. decumbens</i>	+/+++	+/++	+	+	-	+	-	-	-	+
(12 meses)	100%	80%	90%	50%		70%				30%
<i>B. brizantha</i>	+/+++	+	+	-	-	+/++	-	-	-	-
(18 meses)	100%	90%	90%			40%				-
<i>B. brizantha</i>	+/+++	+/++	+	+/+++	+/++	++	+/++		+	-
(4 anos)	40%	90%	80%	50%	40%	10%	60%	-	50%	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 5. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina DBA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos livres de pastagens de *Brachiaria* spp. (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	DBA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
Negativo	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	-
<i>B. decumbens</i>	-	-	-	-	-	-	-	++/+++	++/+++	-
(12 meses)	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	-
<i>B. brizantha</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
(18 meses)	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	-
<i>B. brizantha</i>	-	-	-	-	-	-	-	++/+++	++/+++	-
(4 anos)	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 6. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina UEA I no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	UEA I									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle	-	-	-	+++	++	-	-	+	+	+/+++
Negativo	-	-	-	20%	10%	-	-	20%	20%	50%
<i>B. decumbens</i>	+/+++	-	-	-	+	-	-	-	-	+/+++
(12 meses)	30%	-	-	-	20%	-	-	-	-	20%
<i>B. brizantha</i>	+/+++	-	-	++	-	-	-	++	-	++
(18 meses)	40%	-	-	10%	-	-	-	30%	-	20%
<i>B. brizantha</i>	-	-	-	++/+++	-	-	-	+/+++	+	+/+++
(4 anos)	-	-	-	50%	-	-	-	40%	40%	30%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 7. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina RCA₁₂₀ no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	RCA ₁₂₀									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle	+	+	-	-	+/+++	+/+++	-	-	-	++
Negativo	20%	20%	-	-	20%	20%	-	-	-	10%
<i>B. decumbens</i>	+/+++	+/+++	+/+++	-	+/+++	+	+/+++	++	+	-
(12 meses)	20%	30%	20%	-	60%	20%	30%	10%	10%	-
<i>B. brizantha</i>	+/+++	++	+	-	+/+++	-	++	++	-	+
(18 meses)	20%	10%	10%	-	30%	-	10%	10%	-	10%
<i>B. brizantha</i>	+	+	+	-	+/+++	+/+++	+	-	-	+
(4 anos)	10%	30%	30%	-	40%	30%	10%	-	-	20%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 8. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PNA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	PNA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle					+				+	+ / ++
Negativo	-	-	-	-	10%	-	-	-	10%	20%
<i>B. decumbens</i>					+					++
(12 meses)	-	-	-	-	10%	-	-	-	-	10%
<i>B. brizantha</i>					-				-	-
(18 meses)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. brizantha</i>					+			++		+++
(4 anos)	-	-	-	-	10%	-	-	20%	-	10%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 9. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina GSL I no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	GSL I									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle			+	+	++ / +++	++	+ / ++		+	+ / ++
Negativo	-	-	30%	10%	70%	80%	50%	-	10%	20%
<i>B. decumbens</i>	+ / ++		+	+ / ++	+ / ++	+	+		+	+
(12 meses)	90%	-	20%	40%	100%	30%	80%	-	60%	40%
<i>B. brizantha</i>	+ / +++	+	+		+ / +++	+ / ++	+ / ++	++	+ / ++	+
(18 meses)	100%	10%	50%	-	100%	50%	70%	10%	40%	40%
<i>B. brizantha</i>	+ / ++	+	+ / ++	-	++	++	+			+ / ++
(4 anos)	20%	30%	90%	-	90%	70%	60%	-	-	70%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 10. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PSA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	PSA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle			+		+ / ++	+ / ++	+			+
Negativo	-	-	80%	-	70%	60%	30%	-	-	30%
<i>B. decumbens</i>	+	+	+		+	+ / ++	+			+ / ++
(12 meses)	30%	50%	80%	-	90%	60%	20%		-	70%
<i>B. brizantha</i>	+ / ++	+	+		+ / ++	+ / ++	+			+ / ++
(18 meses)	30%	40%	90%	-	80%	80%	20%	10%	-	50%
<i>B. brizantha</i>	+	+	+		+ / ++	+ / +++	+		+	+
(4 anos)	20%	60%	90%	-	100%	80%	30%	-	20%	60%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 11. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina LCA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	LCA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle		+	+		+/++	+/+++				+
Negativo	-	70%	80%	-	70%	80%	-	-	-	10%
<i>B. decumbens</i>	+	+	+		+	+/++				+/++
(12 meses)	30%	50%	90%	-	70%	50%	-	-	-	60%
<i>B. brizantha</i>	+	+/++	+		+	+				+/++
(18 meses)	50%	30%	90%	-	70%	70%	-	-	-	70%
<i>B. brizantha</i>	+/++	+	+		+/++	+/+++	+			+
(4 anos)	30%	40%	90%	-	70%	70%	10%	-	-	60%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 12. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PHA-E no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	PHA-E									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle		+/++	+	+	+/++	+/++				+
Negativo	-	50%	70%	10%	60%	80%	-	-	-	10%
<i>B. decumbens</i>	+/+++	+	+		+	+	+			+/++
(12 meses)	70%	70%	100%	-	100%	100%	20%	-	-	70%
<i>B. brizantha</i>	+/++	+	+		+	+				+
(18 meses)	80%	70%	70%	-	80%	80%	-	-	-	70%
<i>B. brizantha</i>	+/++	+/++	+	++	+/++	+/++	+			+
(4 anos)	30%	90%	90%	20%	70%	70%	30%	-	-	60%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 13. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina PHA-L no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	PHA-L									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle		+	+	+/++	+/++	+/++	++			+
Negativo	-	30%	40%	20%	90%	90%	10%	-	-	10%
<i>B. decumbens</i>	+/+++	+	+		+	+	+			+/++
(12 meses)	100%	50%	80%	-	90%	90%	10%	-	-	40%
<i>B. brizantha</i>	+/+++	+	+		+/++	+/++			+	+
(18 meses)	80%	60%	70%	-	70%	100%	-	-	10%	60%
<i>B. brizantha</i>	+/++	+/++	+/++	+/++	+/++	+/++	+/++			+
(4 anos)	30%	50%	40%	60%	80%	100%	80%	-	-	60%

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 14. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina SJA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	SJA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle										
Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. decumbens</i> (12 meses)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. brizantha</i> (18 meses)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. brizantha</i> (4 anos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

Tabela 15. Resumo dos resultados da avaliação da reatividade de ligação da lectina SWGA no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens livres de *Brachiaria* spp (controle) e búfalos mantidos em diferentes pastagens de *Brachiaria* spp.

	SWGA									
	M	MH	GC	DB	K	S	E	P	N	CF
Controle										
Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. decumbens</i> (12 meses)	++/+++ 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. brizantha</i> (18 meses)	++/+++ 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. brizantha</i> (4 anos)	+ /+++ 30%	-	-	++ 40%	-	-	-	-	-	-

M: macrófagos espumosos; MH: membrana de hepatócitos; GC: grânulos citoplasmáticos de hepatócitos; DB: ductos biliares; K: células de Kupffer; S: capilares sinusoides; E: endotélio; P: plasmócitos; N: neutrófilos; CF: células da região centro-folicular; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: ausência de reatividade.

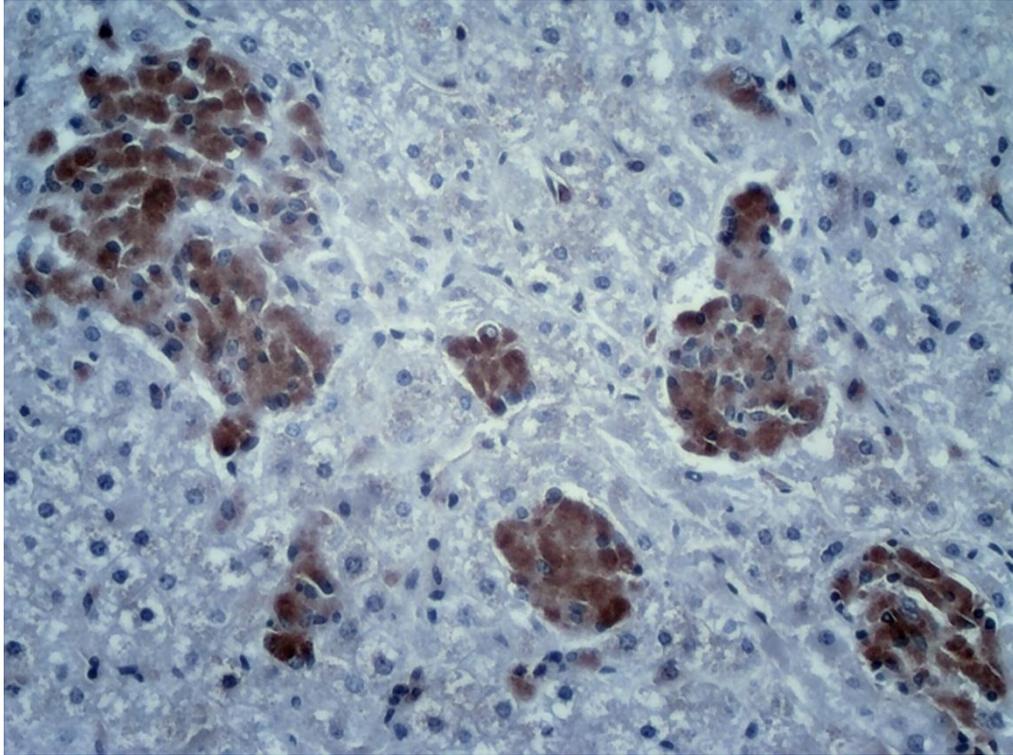


Figura 2. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* por 12 meses (ID 8-24). Acentuada marcação e alta especificidade para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x

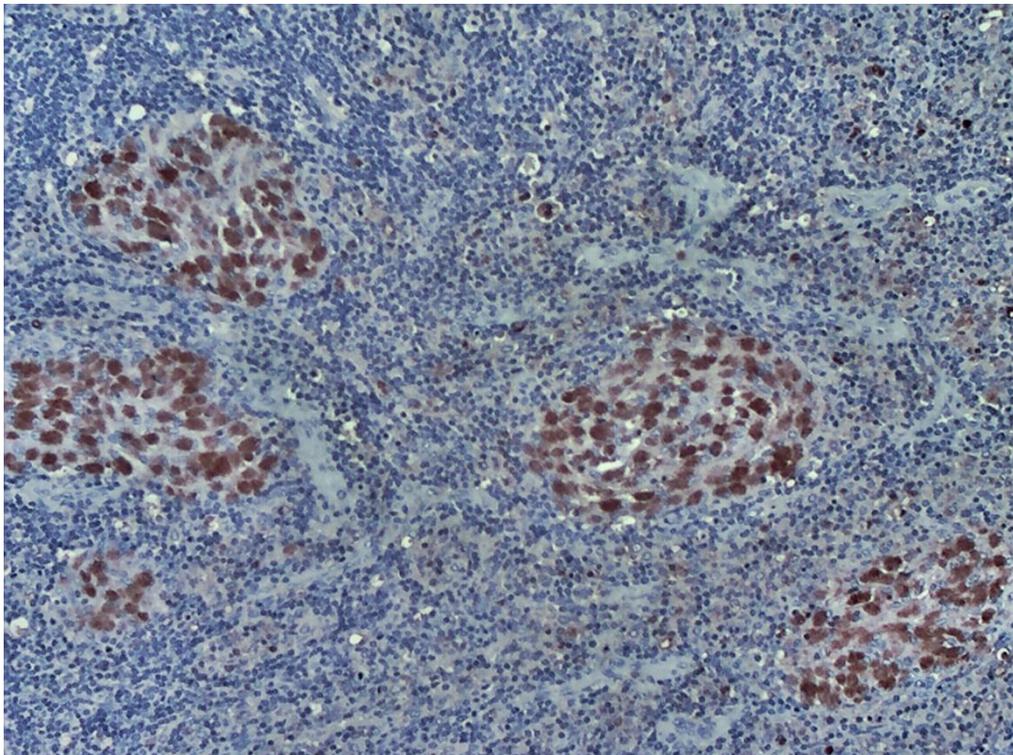


Figura 3. Corte histológico de linfonodo mesentérico de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* por 12 meses (ID 8-24). Acentuada marcação para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 10x

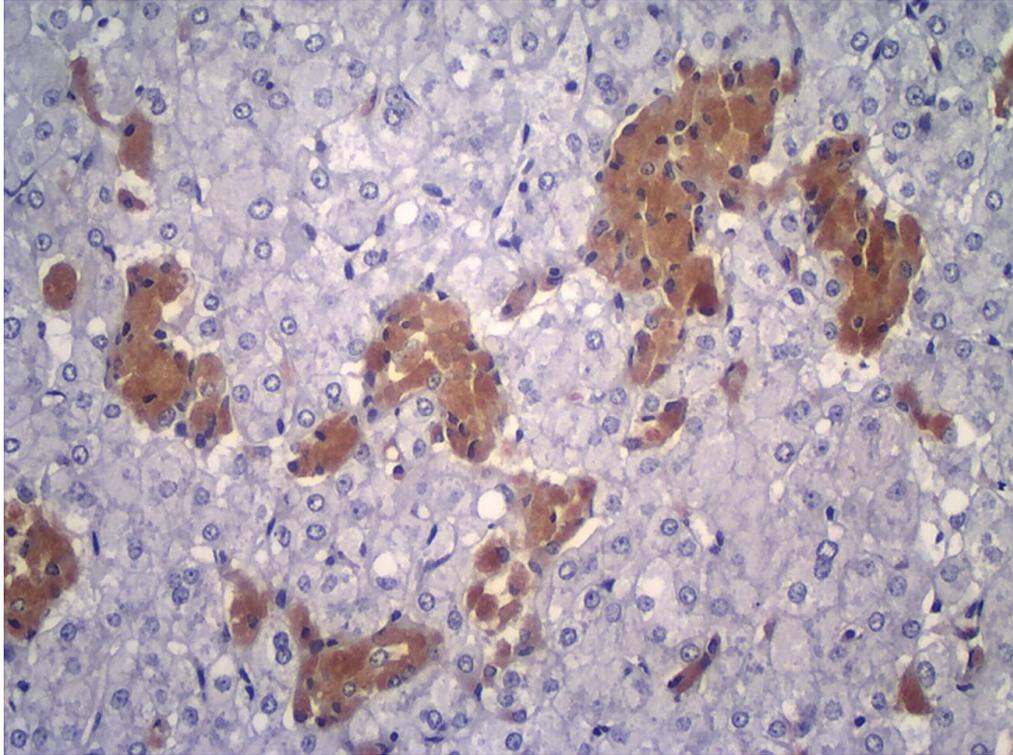


Figura 4. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Acentuada marcação e alta especificidade para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x

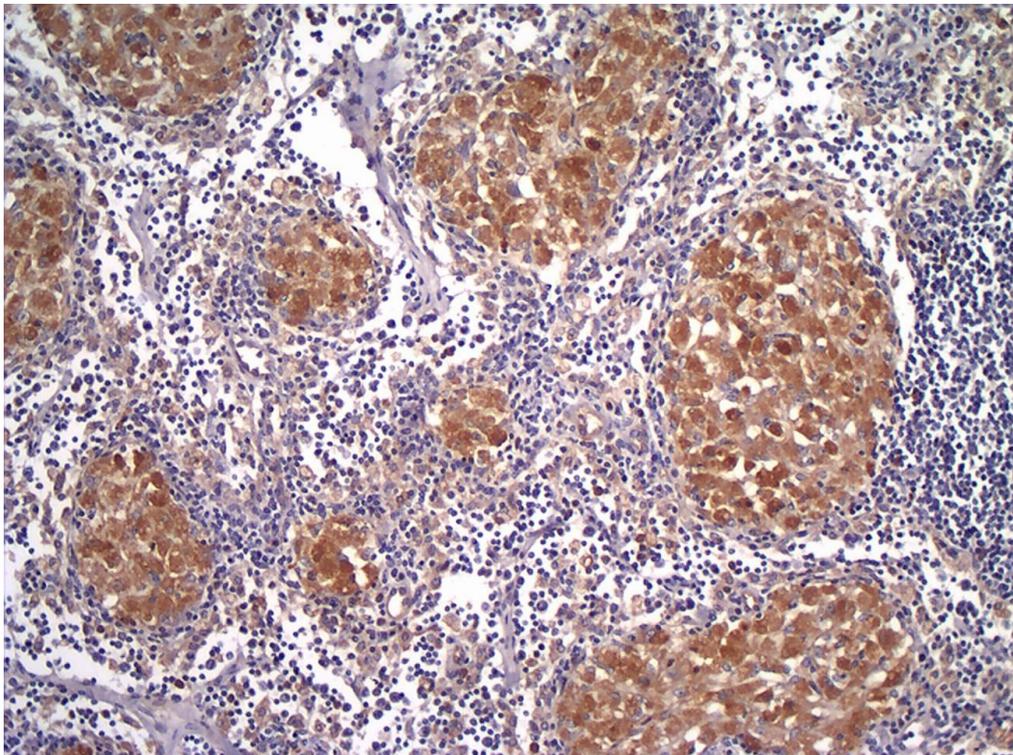


Figura 5. Corte histológico de linfonodo mesentérico de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Acentuada marcação para a lectina SWGA em macrófagos espumosos. Obj. 10x

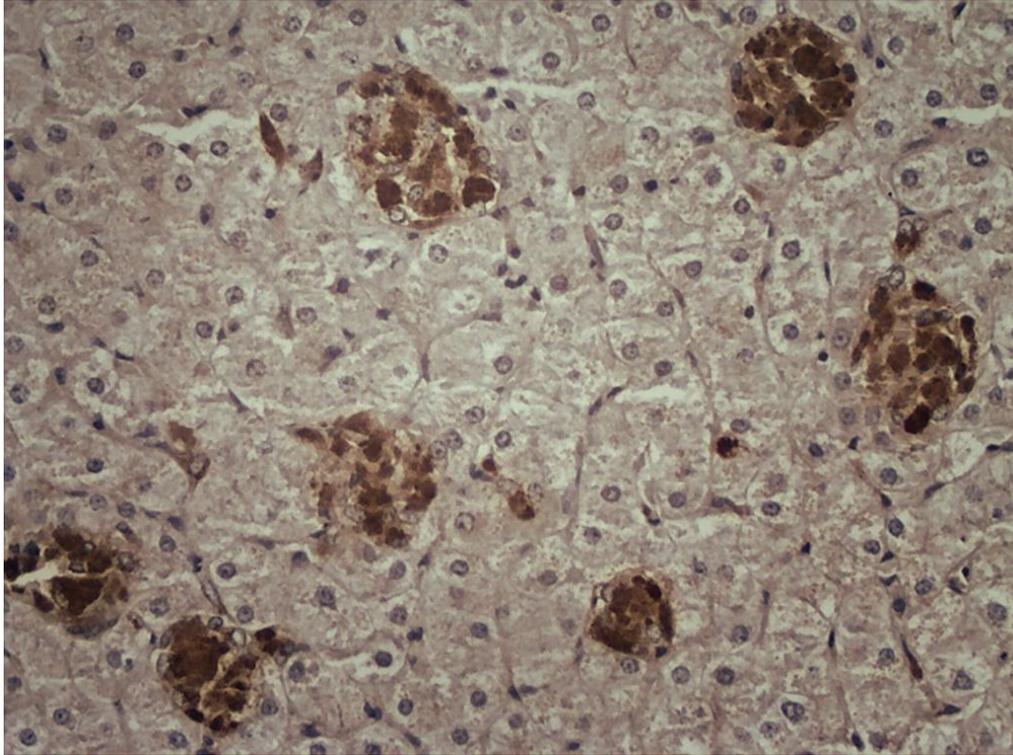


Figura 6. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* por 12 meses (ID 8-24). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina WGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x

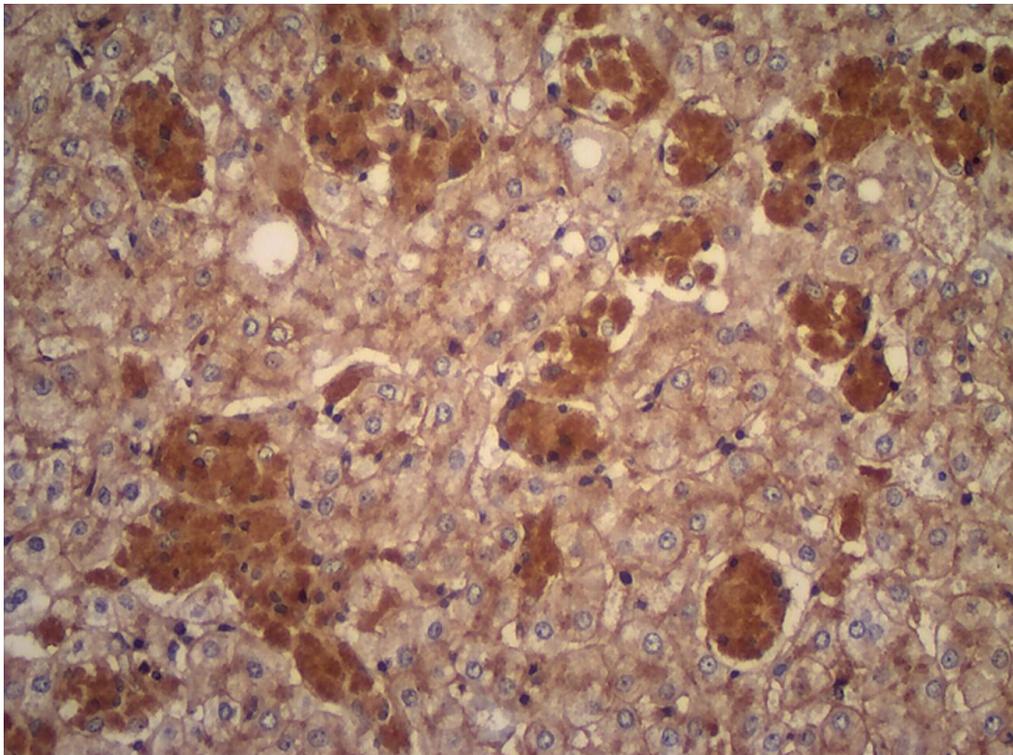


Figura 7. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina WGA em macrófagos espumosos. Obj. 20x

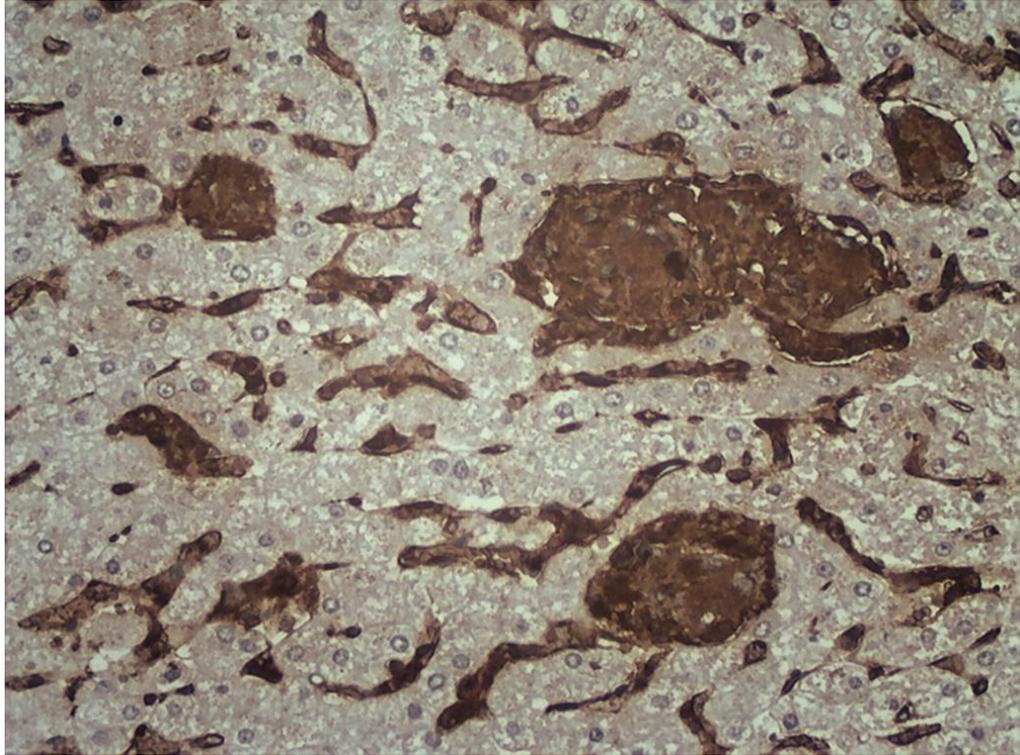


Figura 8. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* por 12 meses (ID 8-24). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina GSL I em macrófagos espumosos. Obj. 20x

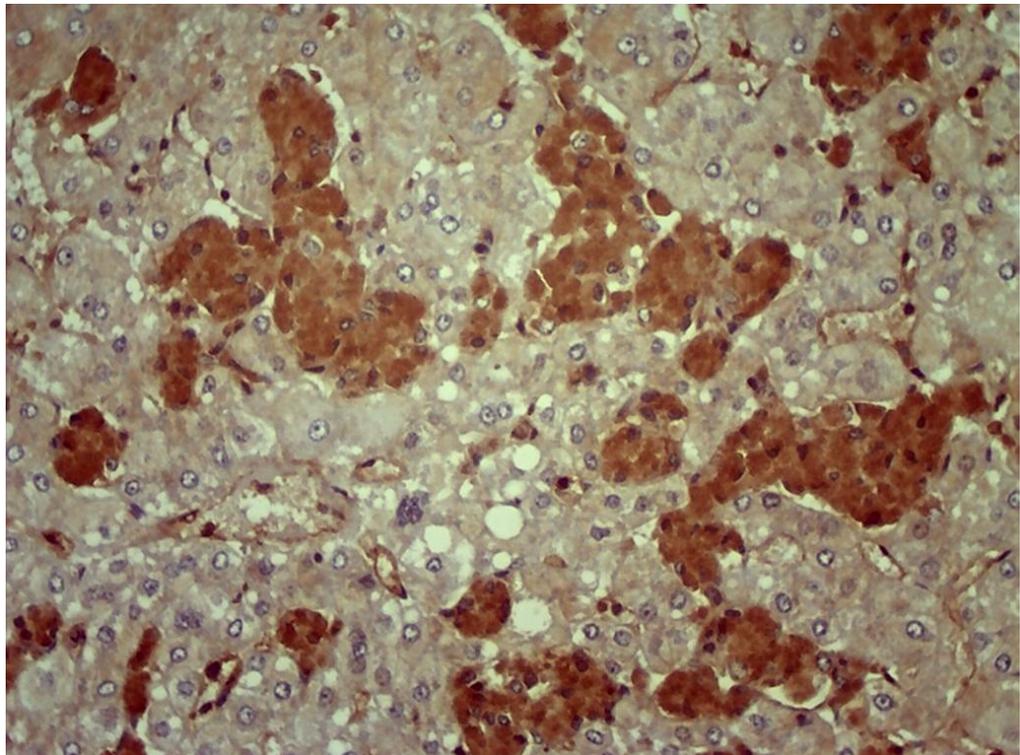


Figura 9. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina GSL I em macrófagos espumosos. Obj. 20x

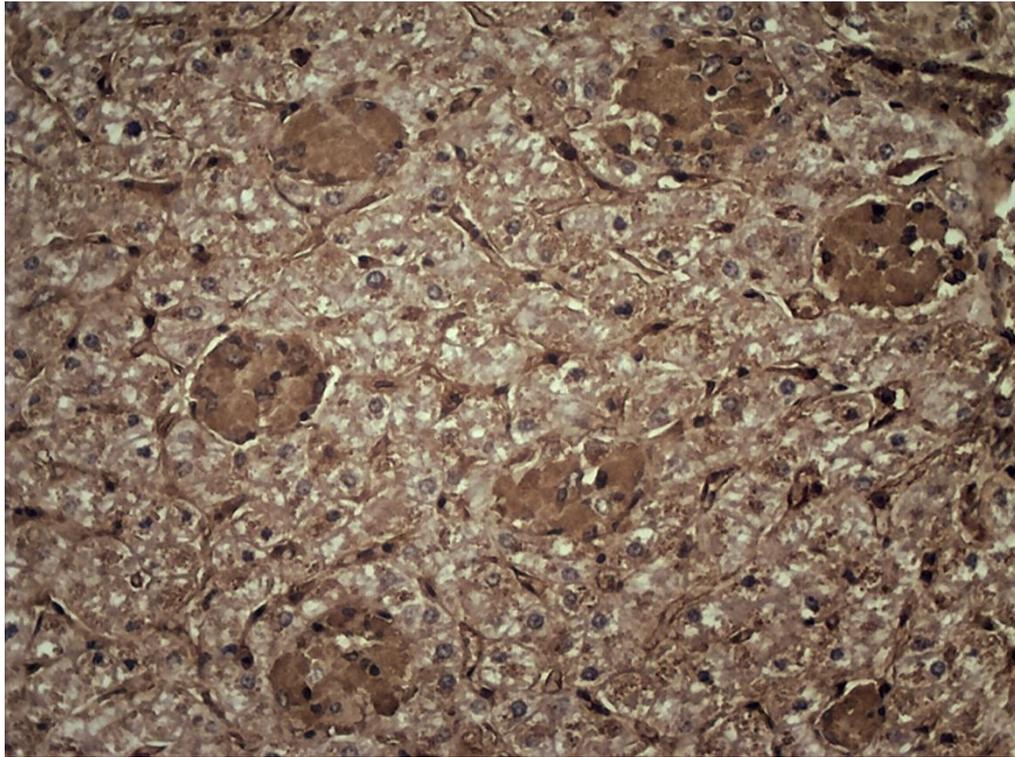


Figura 10. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* por 12 meses (ID 8-24). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-E em macrófagos espumosos. Obj. 20x

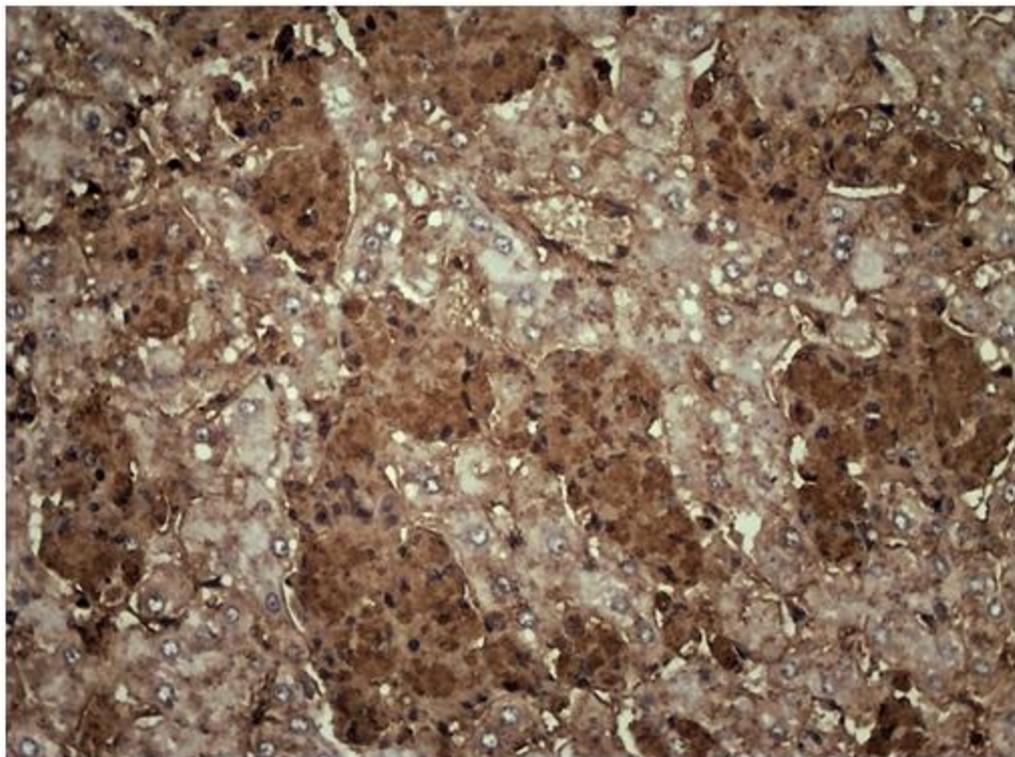


Figura 11. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-E em macrófagos espumosos. Obj. 20x

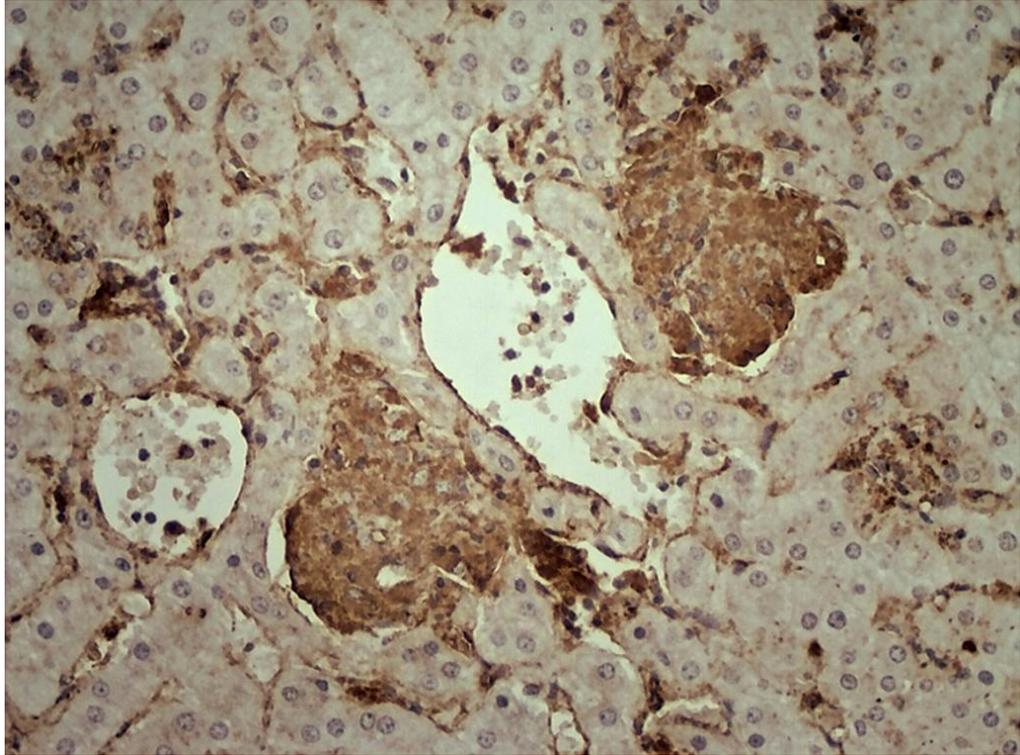


Figura 12. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* por 12 meses (ID 8-24). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-L em macrófagos espumosos. Obj. 20x

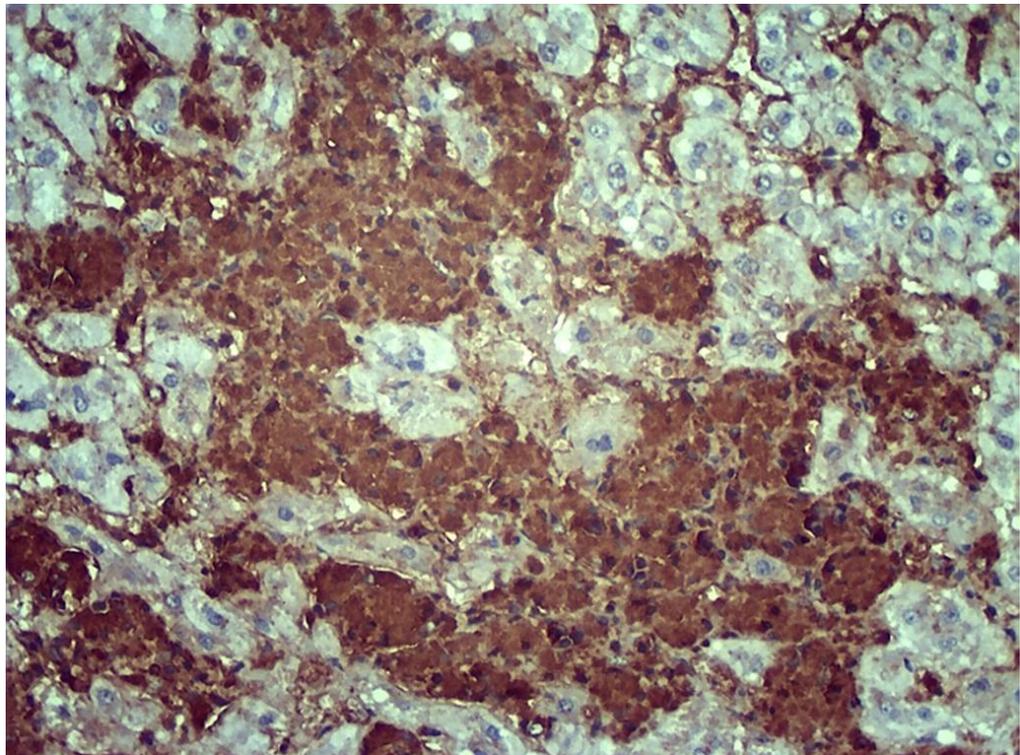


Figura 13. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Acentuada marcação e baixa especificidade para a lectina PHA-L em macrófagos espumosos. Obj. 20x

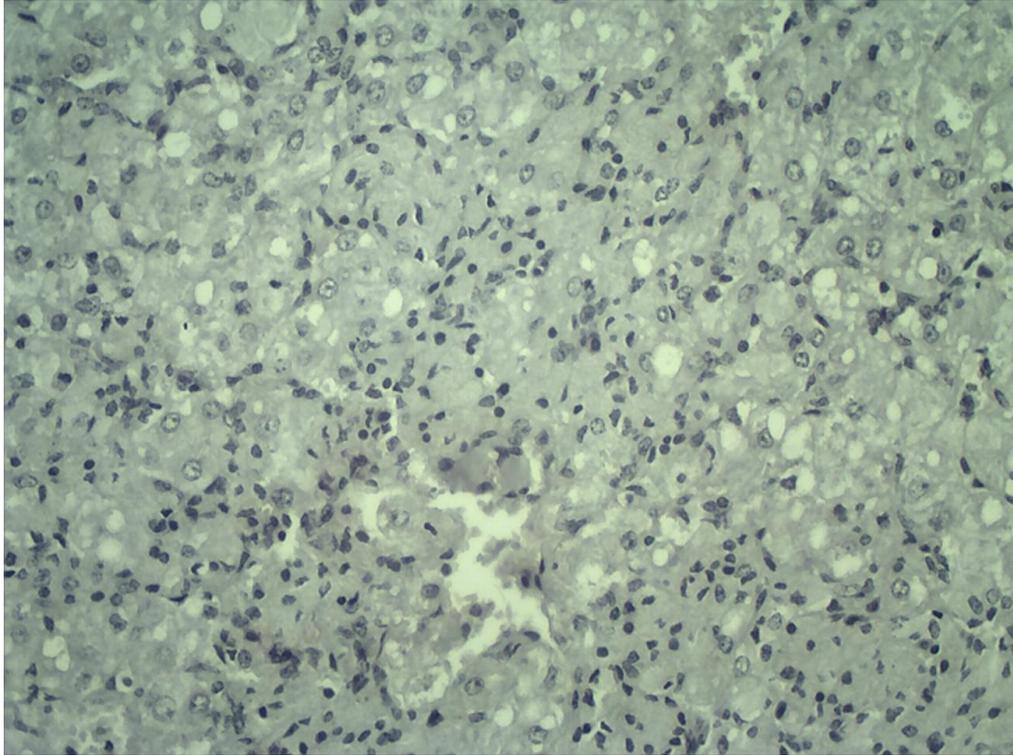


Figura 14. Corte histológico de fígado de búfalo mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* por 18 meses (ID 14-17). Ausência de marcação para a lectina PNA em macrófagos espumosos. Obj. 20x

5 DISCUSSÃO

A melhor compreensão da utilidade da lectino-histoquímica no diagnóstico de fotossensibilização determinada por agentes/plantas que contenham saponinas esteroidais ou outros compostos tóxicos – neste caso, as plantas do gênero *Brachiaria* – passa, necessariamente, pela verificação da constância e especificidade com que estes compostos impregnam os diversos tecidos de animais de diferentes espécies que as ingeriram (COSTA et al., 2013). Em estudos anteriores, por meio da lectino-histoquímica foi possível detectar glicoconjugados em tecidos de **bovinos** que se alimentavam em pastos de *B. decumbens* e *B. brizantha* (GOMAR et al., 2005). As lectinas PNA, WGA e SBA foram as que demonstraram maior afinidade pelos macrófagos espumosos, células bastante características quando presentes no fígado de animais que pastejam em *Brachiaria* spp. Mais tarde, fígados e linfonodos de **ovinos**, sem fotossensibilização, que se alimentavam exclusivamente de *Brachiaria* spp foram avaliados pela técnica de lectino-histoquímica (BOABAID et al., 2011). As lectinas Con A, RCA, WGA, LCA e PHA-L foram as que apresentaram reatividade mais acentuada em macrófagos espumosos nessa espécie. A seguir, fragmentos de fígado e rim de **ovinos** com fotossensibilização causada por *B. decumbens* foram analisados através da lectino-histoquímica (COSTA et al., 2013). Nesta situação, as lectinas PNA, WGA, SBA, GSL e LCA foram as que apresentaram melhor reatividade aos macrófagos espumosos.

As diluições empregadas por Gomar et al. (2005) foram diferentes das utilizadas neste estudo e nos outros reportados por Boabaid et al. (2011) e Costa et al. (2013). No trabalho com **bovinos**, a diluição das lectinas foi de 30 µg/ml e o tempo de incubação de 1 hora, com exceção da PNA que foi diluída a 10 µg/ml (GOMAR et al., 2005). Já no trabalho com **ovinos**, as lectinas foram diluídas a 5 µg/ml, com exceção da Con-A e RCA (0,5 µg/ml e 3 µg/ml, respectivamente); todas as lectinas foram incubadas “overnight” (BOABAID et al., 2011). Este estudo seguiu o protocolo utilizado por Costa et al. (2013), isto é, foi utilizada a concentração de 5 µg/ml para todas as lectinas, com exceção da Con-A (0,5 µg/ml) e RCA (1 µg/ml). A análise comparativa sugere que a diferença na concentração não interferiu de maneira significativa nos resultados, uma vez que os achados obtidos no trabalho de Costa et al. (2013) e no de Gomar et al. (2005) são similares e diferem, em alguns pontos, dos observados por Boabaid et al. (2011).

No presente estudo, dentre as 14 lectinas testadas, a **SWGA** apresentou acentuada reatividade e revelou-se como a mais específica para a marcação dos macrófagos espumosos em búfalos, que são células que provavelmente contêm saponinas esteroidais misturadas a restos de hepatócitos fagocitados após degenerarem ou necrosarem em decorrência do excesso destas substâncias (DRIEMEIER et al., 1999). Dos três estudos de avaliação lectino-histoquímica em tecidos de animais mantidos em pastagens de *Brachiaria* citados anteriormente, apenas o mais recente testou a lectina SWGA em tecidos de ovinos (COSTA et al., 2013). No referido trabalho, entretanto, esta lectina apresentou apenas leve reatividade e baixa especificidade para os macrófagos espumosos, um resultado não considerado significativo. Além da *diferença entre as espécies* dos animais utilizados no presente estudo e no de Costa et al. (2013) que, possivelmente, já pode influenciar no metabolismo dos glicoconjugados e na consequente marcação lectino-histoquímica, também há que se considerar que os ovinos do estudo anterior apresentavam fotossensibilização, uma condição ausente nos búfalos deste trabalho. Pelo fato dos estudos de Gomar et al. (2005) e Boabaid et al. (2011) não terem testado a lectina SWGA, não é possível estabelecer maiores comparações acerca da diferença de reatividade desta lectina.

Em contraste, alguns estudos de avaliação lectino-histoquímica em animais intoxicados por *Brachiaria* spp, previamente reportados, revelaram alta especificidade dos macrófagos espumosos à lectina **PNA**, com acentuada reatividade nos estudos de Gomar et al.

(2005) e Costa et al. (2013). Já na avaliação de Boabaid et al. (2011) houve apenas leve reatividade, enquanto no presente trabalho a PNA não reagiu com os macrófagos espumosos dos animais avaliados (**Figura 14**).

Ainda não se sabe exatamente a que atribuir a diferença de reatividade de ligação aos macrófagos espumosos, mas é possível que a *natureza do material acumulado* pelos macrófagos possa variar em função da *fase de crescimento da planta*, ou de acordo com o *tipo e a proporção de glicoconjugados* armazenados nas plantas em decorrência da época do ano. Sabe-se que, dependendo da espécie animal, o fígado pode reagir de maneiras diferentes à ingestão de uma mesma substância tóxica. Além disso, é bom lembrar que equinos com fotossensibilização causada pela ingestão de *B. humidicola* não apresentam os típicos macrófagos espumosos encontrados no fígado de ruminantes intoxicados, e imagens negativas de cristais no interior de ductos biliares raramente estão presentes (BARBOSA et al., 2006). Apesar de também serem sensíveis à intoxicação por *Brachiaria* spp, os bubalinos são mais resistentes que os bovinos e, devido ao fato de comumente não apresentarem fotossensibilização, mesmo com acentuada gravidade de lesões hepáticas, são considerados animais resilientes à intoxicação pela gramínea (RIET-CORREA et al., 2010). É possível que a pelagem escura dos búfalos possua um papel importante neste processo ao proporcionar maior proteção da pele aos raios ultravioleta. Sugere-se, ainda, que diferenças de reatividade às lectinas também possam ocorrer devido a particularidades no metabolismo da espécie do animal em questão, da presença ou não de fotossensibilização, da evolução clínica e do tempo de ingestão dos glicoconjugados (COSTA et al., 2013).

Apesar da baixa especificidade e da maior variação de intensidade, as lectinas **WGA**, **GSL I**, **PHA-E** e **PHA-L** reagiram com os macrófagos espumosos detectados no fígado e linfonodo mesentérico dos búfalos do presente trabalho. Essas lectinas, porém, foram consideradas de menor especificidade por também reagirem, mesmo que em menor grau, com células inflamatórias e com a maioria das estruturas hepáticas e vasculares. A acentuada reatividade da lectina **WGA** aos macrófagos espumosos, também verificada nos três estudos lectino-histoquímicos anteriores (COSTA et al., 2013; BOABAID et al., 2011; GOMAR et al., 2005) indica que, independentemente da espécie – bovina, ovina ou bubalina –, para efeito de diagnóstico, os macrófagos espumosos que se formam no fígado, em consequência da ingestão prolongada de saponinas esteroidais são positivos para essa lectina. A lectina **GSL I** foi testada apenas por Costa et al. (2013), que reportaram forte reatividade. As lectinas **PHA-E** e **PHA-L**, avaliadas por Costa et al. (2013) e Boabaid et al. (2011), revelaram uma grande variação de intensidade e baixa especificidade para os macrófagos espumosos, também com variedade de marcação para as células hepáticas. Foi sugerido que uma menor reatividade aos hepatócitos indica menor quantidade de glicoconjugados em comparação aos macrófagos ou, alternativamente, que os resíduos/produtos da degradação celular (organoides) induzida pelos glicoconjugados sejam mais abundantes nos macrófagos (COSTA et al., 2013).

Os achados lectino-histoquímicos observados nos macrófagos espumosos dos animais do presente estudo e dos três anteriores estão sumarizados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Resumo das avaliações lectino-histoquímicas em macrófagos espumosos presentes no fígado de animais que se alimentaram de *Brachiaria* spp.

Lectinas	GOMAR et al. (2005) Bovinos (N = 100)	BOABAID et al. (2011) Ovinos (N = 19)	COSTA et al. (2013) Ovinos (N = 15)	Resultados (2015) Bubalinos (N = 30)
Con A	+ Baixa especificidade	++ Baixa especificidade	+++ Baixa especificidade	-
SBA	+++ Baixa especificidade	-	++ Baixa especificidade	-
WGA	++ Baixa especificidade	++ Baixa especificidade	++ Baixa especificidade	++/+++ Baixa especificidade
DBA	-	Não avaliada	-	-
UEA I	-	Não avaliada	-	-
RCA ₁₂₀	-	++ Baixa especificidade	+++ Baixa especificidade	-
PNA	+++ Alta especificidade	+ Alta especificidade	+++ Alta especificidade	-
GSL I	Não avaliada	Não avaliada	++ Baixa especificidade	+ /+++ Baixa especificidade
PSA	Não avaliada	+ Baixa especificidade	-	-
LCA	Não avaliada	++ Baixa especificidade	++ Baixa especificidade	-
PHA-E	Não avaliada	-	+ /++ Baixa especificidade	+ /+++ Baixa especificidade
PHA-L	Não avaliada	++ Baixa especificidade	+ /+++ Baixa especificidade	+ /+++ Baixa especificidade
SJA	Não avaliada	Não avaliada	-	-
SWGA	Não avaliada	Não avaliada	+ /++ Baixa especificidade	+++ Alta especificidade

N: número de animais avaliados; +++: reatividade acentuada; ++: reatividade moderada, +: reatividade leve, -: reatividade não significativa ou ausência de reatividade.

No presente trabalho, não foram observadas diferenças na intensidade de marcação dos macrófagos espumosos entre os respectivos fragmentos de **fígado e linfonodo mesentérico** dos búfalos de cada grupo. Embora existam relatos de que a concentração da saponina esteroideal protodioscina é significativamente maior na *B. decumbens* do que na *B. brizantha* (LIMA et al., 2009), não houve diferença significativa de reatividade ou especificidade lectino-histoquímica entre os búfalos do presente estudo que foram mantidos em pastagens de *B. decumbens* por 12 meses e *B. brizantha* por 18 meses.

Curiosamente, nos tecidos dos búfalos que se alimentaram de *B. brizantha* por aproximadamente quatro anos, observou-se uma **diminuição** tanto na presença de macrófagos espumosos, quanto na **intensidade de reação da lectina SWGA**, com variedade de marcação leve a acentuada em apenas 30% dos fragmentos avaliados. Por outro lado, neste mesmo grupo, houve moderada reatividade de ligação da lectina **SWGA** aos ductos biliares em 40% dos fragmentos de fígado analisados. A diminuição da presença e marcação lectino-histoquímica dos macrófagos espumosos nos tecidos dos búfalos que ingeriram *B. brizantha* durante mais tempo indica que os animais podem passar por um processo de adaptação de acordo com o tempo de ingestão da planta e melhorar a capacidade de metabolização de saponinas esteroidais.

Adicionalmente, no presente estudo, as lectinas Con A, SBA, DBA, UEA I, RCA₁₂₀, PNA, PSA, LCA e SJA não apresentaram reatividade ou especificidade significativas para a marcação do acúmulo de glicoconjugados e seus subprodutos no fígado e no linfonodo mesentérico de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. A lectina **DBA**, contudo, mostrou-se excelente para a marcação de células inflamatórias em todos os tecidos avaliados, particularmente para plasmócitos e neutrófilos. Por outro lado, assim como no estudo de

Costa et al. (2013), a lectina UEA I reagiu de forma moderada a acentuada aos ductos biliares do fígado e, como esperado, não reagiu com as células endoteliais dos vasos sanguíneos, pois sabe-se que esta lectina é específica para o endotélio vascular de humanos (ALROY et al., 1987). Apesar da ampla variação de marcação e intensidade, o endotélio vascular dos búfalos deste trabalho apresentou reatividade às lectinas RCA₁₂₀, PSA e LCA.

Os resultados do presente trabalho indicam que os macrófagos espumosos de búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp contêm principalmente **N-Acetilglucosamina** (ligação com SWGA e WGA) e, em menor quantidade, **α -D-Galactose** e **α -N-Acetilgalactosamina** (ligação com GSL I) e outras estruturas mais complexas ligadas à **manose** (ligação com PHA-E e PHA-L). Mesmo inédito, o significado da acentuada marcação com a lectina SWGA assemelha-se parcialmente aos estudos lectino-histoquímicos em animais intoxicados por *Brachiaria* spp realizados até o presente momento, que sugerem que os macrófagos espumosos contêm quantidades significativas de D-Galactose, N-Acetilgalactosamina e N-Acetilglucosamina (GOMAR et al., 2005; BOABAID et al., 2011; COSTA et al., 2013). É possível, porém, que, em búfalos, a quantidade de N-acetilglucosamina seja armazenada em maiores quantidades no interior de macrófagos espumosos, de acordo com a acentuada reatividade da lectina **SWGA**.

Em casos de esfingomielinose (doença de Niemann-Pick), macrófagos espumosos podem estar presentes em tecidos não nervosos, como fígado, baço, pulmão, rim, adrenal, linfonodo e tonsila. Nos casos de esfingomielinose felina, o material armazenado foi positivo para Con A, RCA₁₂₀ e WGA (KAMIYIA et al., 1991). Já a avaliação lectino-histoquímica do fígado e baço de humanos com doença de Niemann-Pick, demonstrou que as lectinas Con-A, PNA e SBA foram as que melhor reagiram com as células afetadas (LAGERON, 1987) e são semelhantes aos resultados de Gomar et al. (2005) e Costa et al. (2013). Este padrão lectino-histoquímico também é parcialmente comparável ao encontrado nas células espumosas em fígado e baço de humanos com doença de Hurler (uma mucopolissacaridose tipo I causada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase), que são positivas para PNA, WGA e TPA (*Tetragonolobulus purpureus*) (FARAGGIANA et al., 1982). Todavia, em nenhum dos estudos recém-mencionados testou-se a lectina SWGA nos tecidos avaliados.

Uma deficiência hereditária de lipase ácida lisossomal, conhecida como doença de Wolman (Xantomatose familiar ou lipidose familiar de Wolman) leva ao aparecimento de células espumosas que se agregam sob a forma de ilhotas nos sinusóides do fígado, causando o acúmulo de ésteres de colesterol, colesterol livre e triglicérido no fígado dos indivíduos acometidos devido à diminuição da atividade da dessa enzima (KURIWAKI; YOSHIDA, 1999). Devido ao seu comportamento anfifílico e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídeos de membrana, as saponinas são capazes de alterar as propriedades da membrana celular, o que altera sua permeabilidade ou causa sua destruição (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004). Assim como já foi sugerido para bovinos e ovinos (GOMAR et al., 2005; BOABAID et al., 2011; COSTA et al., 2013), dadas as características morfológicas e histoquímicas dos macrófagos espumosos observados na intoxicação por *Brachiaria* spp serem semelhantes às encontradas nas células espumosas na doença de Wolman, sugere-se que a inibição da lipase ácida lisossomal também possa estar envolvida na patogênese das células espumosas encontradas nos búfalos. Em cabras com α -manosidose, uma doença do armazenamento causada pela intoxicação por *Ipomoea verbascoidea*, a lectina SWGA também reage fortemente com as células de Purkinje do cerebelo, ácinos pancreáticos e células foliculares da tireoide, em um padrão lectino-histoquímico de reatividade também para Con A, WGA, LCA, PSA, PHA-E, RCA₁₂₀ e PNA, o que corrobora parcialmente com os relatos anteriores de manosidose em humanos, gatos e bezerros, e intoxicação por outras plantas, tais como *I. carnea* subsp. *fistulosa*, *I. sericophylla*, *I. riedelii*, *Swainsona* spp, *Sida carpinifolia* e *Tilia cordata* (MENDONÇA et al., 2012).

De fato, a semelhança entre o padrão lectino-histoquímico do material acumulado nos macrófagos espumosos de animais que se alimentam de *Brachiaria* spp e nas células afetadas por doenças do armazenamento também pode indicar alguma **similaridade na patogênese** destas doenças. Sabe-se que a maioria das plantas responsáveis por causar doença do armazenamento lisossomal contém os alcalóides swainsonina e calesteginas como principais princípios ativos, responsáveis pela toxicidade da planta. A swainsonina é um alcalóide indolizidínico, potente inibidor da α -manosidase lisossômica e α -manosidase II do complexo de Golgi (SCHWARZ et al., 2004). A diminuição da atividade da α -manosidase resulta no acúmulo lisossomal de oligossacarídeos incompletamente processados, perda da função celular seguida de morte da célula. A α -manosidase II está envolvida no processamento de oligossacarídeos, de forma que sua deficiência causa alterações na síntese, no processamento e no transporte de glicoproteínas, resultando em disfunção na adesão celular à moléculas, hormônios e vários receptores de membrana, que leva ao acúmulo de oligossacarídeos que contém manose nos lisossomos (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013). A inibição destas duas enzimas pela swainsonina ocorre de forma competitiva, porém, em concentrações mais elevadas, este alcalóide inibe também a α -glicosidase, β -glicuronidase, β -galactosidase, β -xilosidase e α -arabinosidase (CENCI DI BELLO et al., 1989). As calesteginas possuem também atividade inibitória sobre as enzimas β -glicosidase, α - e β -galactosidase e β -xilosidase, pois possuem estrutura semelhante à de carboidratos (ASANO et al., 1997). Apesar da capacidade das calesteginas de causar sinais clínicos ainda não ter sido estabelecida (MENDONÇA et al., 2012), esta inibição competitiva em relação às glicosidases explica a afinidade existente entre as calesteginas e a swainsonina, exacerbando, quando presentes numa mesma planta, a ação tóxica desta última (WATSON et al., 2001).

A participação das saponinas esteroidais que induzem peroxidação lipídica na fotossensibilização causada por *Brachiaria* spp tem sido bem estabelecida (TOKARNIA et al., 2012), mas os mecanismos moleculares envolvidos na intoxicação pela gramínea que levam ao acúmulo de glicoconjugados nos tecidos continuam desconhecidos. Presumivelmente, dependendo do grau de intoxicação do animal, a inibição "em série" de um conjunto de hidrolases lisossomais relacionadas aos componentes glicosilados pode estar envolvida no processo, tais como N-acetilglicosaminidase, N-acetilgalactosaminidase, α -galactosidase e α -manosidase. É possível, ainda, que o material armazenado nas células espumosas possa se acumular devido à inibição de uma hidrolase em particular, causando lipidose lisossomal, assim como foi sugerido em casos de xantomatose familiar (KURIWAKI; YOSHIDA, 1999). Ou, por outro lado, ao invés de uma deficiência enzimática, o acúmulo pode ser resultado da formação de complexos de lipídeos resistentes ao metabolismo por modificações primárias no retículo endoplasmático (GOMAR et al., 2005).

Perspectivas futuras: sugere-se que a lectina **SWGA** seja criteriosamente utilizada em futuras investigações de intoxicação por *Brachiaria* spp em animais de produção. São necessários estudos aprofundados de avaliação lectino-histoquímica em conjunto com outros testes bioquímicos e histoquímicos para caracterizar completamente as lesões hepáticas causadas pela intoxicação por *Brachiaria* spp. A patogenia desta enfermidade ainda não foi esclarecida e a sua complexidade demanda a utilização de metodologias com maior controle de variáveis, tais como a padronização dos animais em questão (espécie, raça, sexo e idade), da pastagem (espécie, variedade, estágio de desenvolvimento, época do ano e duração do pastejo) e da análise das amostras, de acordo com o teste a ser avaliado.

6 CONCLUSÕES

- A lectina SWGA apresentou acentuada reatividade e especificidade para macrófagos espumosos no fígado e linfonodo mesentérico de búfalos que se alimentaram em diferentes pastos de *Brachiaria* spp.
- Não houve diferença significativa de reatividade ou especificidade lectino-histoquímica aos macrófagos espumosos entre os búfalos que foram mantidos em pastagens de *B. decumbens* por 12 meses e *B. brizantha* por 18 meses.
- A diminuição da presença e marcação lectino-histoquímica dos macrófagos espumosos nos tecidos dos búfalos que ingeriram *B. brizantha* durante mais tempo indica que os animais podem passar por um processo de adaptação, de acordo com o tempo de ingestão da planta.
- A avaliação lectino-histoquímica pode ser utilizada para caracterizar o material armazenado em macrófagos espumosos presentes em búfalos que se alimentam em pastagens de *Brachiaria* spp e ajudar na compreensão da patogênese de formação destas células.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERNAZ, T.T.; SILVEIRA, J.A.S.; SILVA, N.S.; OLIVEIRA, C.H.S.; REIS, A.S.B.; 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.
- ALROY, J.; UCCI, A.A.; GOYAL, V.; WOODS, W. LectinHistochemistry of Glycolipid Storage Diseases on Frozen and Paraffin-Embedded Tissue Sections. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v.34, n.4, p.501-505, 1986.
- ALROY, J.; GOYAL, V.; SKUTELSKY, E. Lectin histochemistry of mammalian endothelium. Histochemistry, v.86, p.603-607, 1987.
- ARMÍÉN, A.G.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; FRESE, K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). Veterinary Pathology, v.44, p.170-184, 2007.
- ASANO, N.; KATO, A.; KIZU, H.; MATSUI, K.; GRIFFITHS, R.C.; JONES, M.G.; WATSON, A. A.; NASH, R. J. Enzymatic synthesis of the glycosides of calystegines B1 and B2 and their glycosidase inhibitory activities. Carbohydrate Research, v.304, p.173-178, 1997.
- BARBEITO, C.; MASSONE, A.R.; QUIROGA, M.A; Introduction a las técnicas de lectinhistoquímica. Aplicaciones em Patología Veterinária. Decimoseptimo curso internacional de posgrado em técnicas de inmunohistoquímica, lectinhistoquímica y microscopia electronica, p.117, 2005.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; RIET-CORREA, F. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). Pesquisa Veterinária Brasileira, v.23, n.4, p.167-172, 2003.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. Intoxicações experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.25, n.4, p.231-234, 2005.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO P.V. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.26, n.3, p.147-153, 2006.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; PINHEIRO, C.; LOPES, C.T.A.; MARQUIORE, D.; BRITO, M.F.; YAMASAKI, E.M.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) em bubalinos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.12, p.1049-52, 2010.
- BARBOSA, J.D.; TOKARNIA, C.H.; ALBERNAZ, T.T.; OLIVEIRA, C.M.C; SILVA, N.S; SILVEIRA, J.A.S.; REIS, A.S.B.R; LIMA, D.H.S. Intoxicação natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos na Ilha do Marajó, Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, n.9, p.869-71, 2012.

- BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K.B.; FERNANDES, C.E.; MARTINS, C.F.; PINTO, G.S.; CASTRO, V.S.; REZENDE, K.G.; RIET-CORREA, F.; HARAGUCHI, M.; WYSOCKI JUNIOR, H.L.; LEMOS, R.A.A. Variations of saponin level X maturation in *Brachiaria brizantha* leaves: Preliminary data. In: International Symposium on Poisonous Plants, João Pessoa, p.13, 2009.
- BARONDES, S.H. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science*, v.223, p.1259-64, 1984.
- BASTIANETTO, E.; CUNHA, A.P.; BELLO, A. Intoxicação de bezerros búfalos por *Lantana* spp. em Minas Gerais: relatos de casos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.29.n.2, p.57-59, 2005.
- BOABAID, F.M.; ANTONIASSI, N.A.B.; PESCADOR, C.A.; SOUZA, M.A.; GASPARETTO, N.D.; CRUZ, C.E.F.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M. Lectin Histochemistry on Sections of Liver and Hepatic Lymph Nodes from Sheep Grazing on *Brachiaria* spp. Em: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; WIERENGA, T. (Eds), *Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins*. CAB International, London, 2011.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J.C.; SCHUMACHER, U. *LectinHistochemistry – a concise practical handbook*. Microscopy Handbooks 36. Bios Scientific Publishers in association with the Royal Microscopical Society, Oxford, p.177, 1997.
- 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.
- BRUM, K.B.; HARAGUCHI M.; GARUTTI, M.B.; NÓBREGA, F.N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M.C.S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. *Ciência Rural*, v.39, n.1, p.279-281, 2008.
- BURAKOVAS, R.G; YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; RIET-CORREA, F; MEDEIROS, R.M.T; DANTAS, A.F.M; MATOS, P.F; KATIKI, L.M; VERÍSSIMO, C.J; BUENO, M.S; BRUM, K.B; FIORAVANTI, M.C.S; BARBOSA NETO J.D; HARAGUCHI, M. Investigação das saponinas furostânicas nas gramíneas de *Panicum*. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 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. Em: 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, 2011.
- CENCI DI BELLO, I.; FLEET, G.; NAMGOONG, S.K.; TADANO, K.; WINCHESTER, B. Structure-activity relationship of swainsonine. *Biochemical Journal*, v.259, p.855- 861, 1989.

- CHEEKE, P.R. Nutritional and physiological implications of saponins: a review. *Canadian Journal of Animal Science*, v.51, p.621-632, 1971.
- CORRÊA, A.M.R.; BEZERRA JUNIOR, P.S.; PAVARINI S.P.; SANTOS, A.S.; SONNE, L.; ZLOTOWSKI, P.; GOMES, G.; DRIEMEIER, D. *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in Murrah buffaloes in Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.3, p.187-189, 2008.
- COSTA, S.Z.R.; NESPOLI, P.B.; JÚNIOR, P.S.B.; 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.
- DAMJANOV, I. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Laboratory Investigation*, v.57, p.5-20, 1987.
- DENNIS, L.W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C.E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1473, p.21-34, 1999.
- DRICKAMER, K.; WEIS, W.I.; TAYLOR, M.E. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews*, v.163, n.1, p.19–34, 1998.
- DRIEMEIER, D., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V., BRITO, M.F. Relação entre macrófagos espumosos (“foam cells”) no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.19, n.2, p.79-83, 1999.
- DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M.; GIMENO, E.J.; BARROS, S.S. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Veterinary Pathology*, v.37, p.153-159, 2000.
- FACCIN, T.C.; RIET-CORREA, F.; RODRIGUES, F.S.; SANTOS, A.C.; MELO, G.K.A.; JONILSON, A.S.; FERREIRA, R.; ITAVOA, C.C.B.F; LEMOS, R.A.A. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. *Toxicon*, v.82, p.1-8, 2014.
- FARAGGIANA, T.; SHEN, S.; CHILDS, C.; STRAUSS, L.; CHURG, J. Histochemical study of Hurler’s disease by the use of peroxidase-labelled lectins. *Histochemical Journal*, v.14, p.655-664, 1982.
- 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. Variation in saponin concentration in *Brachiaria brizantha* leaves as a function of maturation: preliminary data. Em: 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, 2011.
- FLÅØYEN, A.; WILKINS, A.L.; DENG, D.; BREKKE, T. Ovine Metabolism of Saponins: Evaluation of a Method for Estimating the Ovine Uptake of Steroidal Saponins from *Narthecium ossifragum*. *Veterinary Research Communications*, v.25, n.3, p.225-238, 2001.

- FLÅØYEN, A.; WILKINS, A.L.; SANDVIK M. Ruminant metabolism in sheep of saponins from *Yucca schidigera*. *Veterinary Research Communications*, v.26, n.2, p.159-69, 2002.
- GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v.285, p.66, 1980.
- GOMAR, M.S.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M.; GIMENO E. J. Lectin-histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* spp. *Journal of Veterinary Medicine A*, v.52, p.18-21, 2005.
- GRACINDO, C.V.; LOUVANDINI, H.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA-FERREIRA, M.; CASTRO, M.B. Performance of sheep grazing in pastures of *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. *Trop Anim Health Prod*, v. 46, p. 733-737, 2014.
- HSU, S.M.; REE, H.J. Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.31, p.538-546, 1983.
- JONES, TC; HUNT, RD; KING, NW. *Patologia Veterinária*. 6^aed. Editora Manole: Barueri, p1415, 2000.
- KAMIYA, S., YAMAGAMI, T., UMEDA, M., SUGIYAMA, M., DAIGO, M. Lectin histochemistry of foamy cells in non-nervous tissues of feline sphingomyelinosis. *J. Comp. Path.*, v.105, p.241-245, 1991.
- KELLERMAN, T.S.; COETZER, J.A.W.; NAUDÉ, T.W.; BOTHA C.J. *Plant Poisonings and Mycotoxicoses*. Oxford University Press, Cape Town, RSA., p.310, 2005.
- KURIWAKI, K., YOSHIDA, H. Morphological characteristics of lipid accumulation in liver-constituting cells of acid lipase deficiency rats (Wolman's disease model rats). *Pathol. Int.*, v.49, p.291-297, 1999.
- LAGERON, A. Characterization by lectin binding of the sugar moiety of glycoconjugates stored in inherited diseases. *Histochemical journal*, v.19, p.419-425, 1987.
- 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 pastagens com *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v.26, n.1, p.109-113, 1996.
- LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; JUNIOR, G.O.H.; SILVEIRA, A.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.
- LIMA, F.G.; RIBEIRO, C.S.; ANDRADE, D.F.; GUIMARÃES, V.Y.; WYSOCKI JÚNIOR, H.L.; HARAGUCHI, M.; FIORAVANTI, M.C.S. Braquiária: fatores que interferem nos níveis de saponina. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, n.4, p.367-372, 2009.
- 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. IJPPR 2, 45–53, 2012.
- LIMA, F.G.; LEE, S.T.; PFISTER, J.A.; MIYAGI, E.S.; COSTA, G.L.; SILVA, R.D.; FIORAVANTI, M.C.S. The effect of ensiling and haymaking on the concentrations of steroidal saponin in two *Brachiaria* grass species. *Ciência Rural*, v.45, n.5, p.858-866, 2015.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v.98, p.637-674, 1998.
- MASSONE, AR; ITAGAKI, S; DOI, K; GIMENO, E.J. Lectin histochemical study on normal and paratuberculosis-affected bovine ileum. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.53, n.4, p.761-3, 1991.
- MATSUMOTO, H.;MURAMATSU, H.; MURAMATSU, T.; SHIMAZU, H. Carbohydrate profiles shown by a lectin and a monoclonal antibody correlate with metastatic potential and prognosis of human lung carcinomas. *Cancer*, v.69, p.2084-2090, 1992.
- MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Bases da patologia em veterinária. Tradução da 4ª edição. Elsevier, p.1476, 2007.
- MEAGHER, L.P.; MILES, C.O.; FAGLIARI, J.J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. *Veterinary and Human Toxicology*, v.38, n.4, p.271-274, 1996.
- MEAGHER, L.P.; SMITH, B.L.; WILKINS, A.L. Metabolism of diosgenin-derived saponins: implications for hepatogenous photosensitization diseases in ruminant. *Animal Feed Science and Technology*, v.91, p.157-170, 2001.
- MELO-JUNIOR, M.R.; TELLES, M.S.; ALBUQUERQUE, F.E.B.; PONTES FILHO, N.T.; CARVALHO JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.40, n.2, p.123-5, 2004.
- MENDONÇA, F.S.; ALBUQUERQUE, R.F.; EVENCIO-NETO, J.; FREITAS, S.H.; DORIA, R.G.; BOABAID, F.M.; DRIEMEIER, D.; GARDNER, D.R.; RIET-CORREA, F.; COLODEL, E.M. Alpha-mannosidosis in goats caused by the swainsonine-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 24, p. 90-95, 2012.
- MILES, C.O. A role for steroidal saponins in hepatogenous photosensitization. *New Zealand Veterinary Journal*, v.41, n.221, 1993.
- MILES, C.O; WILKINS, A.L; ERASMUS, GL; KELLERMAN, TS; COETZER, J.A.W. Photosensitivity in South Africa. VII. Chemical-composition of biliary crystals from a sheep with experimentally-induced geeldikkop. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.61, n.3, p.215-22, 1994.

- MINERVINO, A.H.H.; BARRETO JUNIOR, R.A.; RODRIGUES, F.A.M.L.; FERREIRA, R.N.F.; REIS, L.F.; HEADLEY, S.A.; ORTOLANI, E.L. Hepatogenous photosensitization associated with liver copper accumulation in buffalos. *Research in Veterinary Science*, v. 88, p. 519–522, 2010.
- MURNAME, R. D.; AHERN-RINDELL, A. J.; PRIEUER, D.J. Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease with deficiencies of beta-galactosidase and alpha-neuraminidase. *American Journal of Pathology*, v.135, n.4, p.623-630, 1989.
- OLESZEK, W.A. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, v.967, p.147-162, 2002.
- OLIVEIRA, C.M.C.; BARBOSA, J.D.; MACEDO, R.S.C.; BRITO, M.F.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.1, p.27-30, 2004.
- OLIVEIRA, C.H.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.; BASTIANETTO E.; MELO M.M.; HARAGUCHI M.; FREITAS L.G.; SILVA M.X.; LEITE, R.C. Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. *Toxicon*, v.73, p.121-9, 2013.
- OLIVEIRA FILHO, J.C.; CARMO, P.M.S.; PIEREZAN, F.; BARROS, C.S.L. *Baccharis megapotamica* var. *weirii* poisoning in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.23, n.3, p.610-4, 2011.
- OLIVEIRA FILHO, J.C.; CARMO, P.M.S.; IVERSEN, A.; NIELSEN, K.F.; BARROS, C.S.L. Experimental poisoning by *Baccharis megapotamica* var. *weirii* in buffalo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.5, p.383-390, 2012.
- OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por plantas que contêm swainsonina no Brasil. *Ciência Rural*, v.43, n.4, p. 653-661, 2013.
- OPASINA, B.A. Photosensitization jaundice syndrome in West African dwarf sheep and goats grazed on *Brachiaria decumbens*. *Tropical Grasslands*, v. 19, p. 120-123, 1985.
- PAPADOPOULOU, K.; MELTON, R.E.; LEGGETT, M.; DANIELS, M.J.; OSBOURN, A.E. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.26, n.96, p.12923-12928, 1999.
- PATALAMAI, B.; HEJTMANCIK, E.; BRIDGES, C.H. et al. The isolation and identification of steroidal sapogenins in kleingrass. *Veterinary and Human Toxicology*, v.32, p. 314-318, 1990.
- PIMENTEL, L.A.; RIET-CORREA, F.; GUEDES, K.M.R.; MACÊDO, J.T.S.A.; MEDEIROS, R.M.T.; DANTAS, A.F.M. Fotosensibilização primária em equídeos e ruminantes no semi-árido causada por *Froelichia humboldtiana* (Amaranthaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.1, p.23-28, 2007.

- PIRES V.S.; TAKETA A.T.C.; GOSMANN G.; SCHENKEL E.P. Saponins and Sapogenins from *Brachiaria decumbens*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.13, n.2, p.135-139, 2002.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; ARUNDEL, J. H. ; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9 Ed. Elsevier Health Sciences, 2000.
- RAPOSO, J. B.; FERNANDES, C. G., BAIALARDI, C.; DRIEMEIER, D. Observações clínicas e bioquímicas em ovinos e bovinos intoxicados experimentalmente por *Myoporum laetum*. Acta Scientiae Veterinariae, 32(1): 9-17, 2004.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.21, n.1, p.38-42, 2001.
- RIET-CORREA, B.; RIET-CORREA, F.; JUNIOR, C.A.O.; DUARTE, V.C.; RIET-CORREA, G. Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.9, p.705-711, 2010.
- 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.
- ROZZA, D.B.; SEITZ, A.L.; BANDARRA, P.M.; SANTOS, E.O.; DRIEMEIER, D. Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em búfalo. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.24, p.55-56, 2004.
- SALAM ABDULLAH, A.; LAJIS, N.H.; BREMNER, J.B. et al. Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. Veterinary and Human Toxicology, v.35, p.154-155, 1992.
- SANTOS, C.E.P.; PESCADOR, C.A.; UBIALI, D.G.; COLODEL, E.M.; SOUZA, M.A.; SILVA, J.A.; CANOLA, J.C.; MARQUES, L.C. Intoxicação natural por *Solanum glaucophyllum* (Solanaceae) em búfalos no Pantanal Matogrossense. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.31, n.12, p.1053-58, 2011.
- SATURNINO, K.C.; MARIANI, T.M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K.B.; FERNANDES, C.E.S.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.3, p.195-202, 2010.
- SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; ATHAYDE, ML. Farmacognosia. C.27 - Saponinas, p.711-40, 2004.
- SCHWARZ, A.; HOSOMI R.Z.; HENRIQUE B.S.; HUEZA I.; GARDNER, D.; HARAGUCHI, M.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Identificação de princípios ativos presentes na *Ipomoea carnea* brasileira. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.40, n.2, p.181-187, 2004.

- SEAWRIGHT, A. A.; LEE, J. S.; ALLEN, J. G.; HRDLICKA, J. Toxicity of *Myoporum* spp and their furanosequiterpenoid essential oils. In: KEELER, R. F.; VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. Effects of Poisonous Plants on Livestock. Academic Press, New York, p.241-250, 1978.
- SEIXAS, J. N. Diferenciação das intoxicações por *Brachiaria* spp e *Pithomyces chartarum* através dos aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e toxicológicos. 228p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.
- SEN, S.; MAKKAR, H.P.S.; BECKERPLANT, K. Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.1, p.131-140, 1998.
- SLIFKIN, M.; DOYLE, R.J. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, p.197-218, 1990.
- 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, 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.
- STANNARD, A. A. Fotossensibilização. In: SMITH, B. P. Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos. São Paulo: Manole, v.2, 1993.
- STEGELMEIER, B.A.; MOLYNEUX, R.J.; ELBEIN, A.D.; JAMES, L.F. The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. *Veterinary Pathology*, v.32, p.289-98, 1995.
- TENNANT, B. C. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th Ed, London: Academic Press, p.327-352, 1997.
- TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J. Relatório de viagem. p.9, 1983. (Datilografado)
- TOKARNIA, C.H.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; BRITO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BARBAS. L.A.L. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.2, p.74-79, 2004.
- TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção. 2ª Ed., p.566, 2012.
- TULSIANI, D.R.P.; TOUSTER, O. Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver Golgi preparations. *Journal of Biological Chemistry*, v.258, p.7578-85, 1983.

- USHIYAMA, M.; IKEDA, S.; NAKAYAMA, J.; YANAGISAWA, N.; HANYU, N.; KATSUYAMA, T. Type III G_{M1}-gangliosidosis histochemical and ultrastructural studies of rectal biopsy. *Journal of the Neurological Sciences*, v.71, p.209-223, 1985.
- WATSON, A.A.; FLEET, G.W.J.; ASANO, N.; MOLYNEUX, R.J.; NASH, R.J. Polyhydroxylated alkaloids – natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry*, v. 56, p. 265-295, 2001.
- YANG, C.R.; ZHANG, Y.; JACOB, M.R.; KHAN, S.I.; ZHANG, Y.J.; LI, X.C. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, n.5, p.1710-14, 2006.

8 ANEXOS

Anexo A – RIET-CORREA, B.; RIET-CORREA, F.; JUNIOR, C.A.O.; DUARTE, V.C.; RIET-CORREA, G. Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.9, p.705-711, 2010.

Pesq. Vet. Bras. 30(9):705-711, setembro 2010

Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp.¹

Beatriz Riet-Correa², Franklin Riet-Correa³, Carlos Alberto de Oliveira Junior², Valíria C. Duarte² e Gabriela Riet-Correa²

ABSTRACT. Riet-Correa B., Riet-Correa F., Oliveira Junior C.A., Duarte V.C. & Riet-Correa G. 2010. [Histologic lesions in livers and lymph nodes in buffalo (*Bubalus bubalis*) grazing in *Brachiaria* spp. pastures.] Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) em pastagens de *Brachiaria* spp. Pesquisa Veterinária Brasileira 30(9):705-711. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Rua Maximino Porpino da Silva 1000, Castanhal, PA 68743-080, Brazil. E-mail: griet@ufpa.br

Infiltration by foamy macrophages and other lesions are reported in healthy cattle held in *Brachiaria* spp. pastures. With the objective to study histologic lesions in the liver and mesenteric lymph nodes in buffalo in the state of Pará, samples of liver and lymph nodes of 142 buffalo Murah and 15 Nelore cattle were studied histologically. The samples were collected in a slaughterhouse and divided into groups of animals according to their origin and period of grazing *Brachiaria* spp. pastures. Group (G) 1 consisted of 79 buffalo from Marajó Island, raised in native pastures free of *Brachiaria* spp.; G2 was composed of 17 buffalo kept since birth in *Brachiaria brizantha* pastures; G3 was composed of 29 buffalo purchased in Marajó Island and introduced in *B. decumbens* pastures where they stayed for nearly 12 months; G4 consists of 17 buffalo purchased in Marajó Island and introduced in *B. brizantha* pastures where they stayed for nearly 18 months. G5 was composed of 15 Nelore cattle grazing *B. brizantha* during one year period. To assess the degree of liver injury, grades following a scale of 0 to 4 were established according to the quantity and size of groups of foamy macrophages. In G1, from the Marajó Island, there were no significant histological changes in liver and lymph nodes. Foamy macrophages and other lesions were observed in liver and lymph nodes of all samples from G1, G2, G3, and G4. The animals from G2 and G4, which remained a longer period in *Brachiaria* spp., showed more pronounced infiltration of foamy macrophages ($P < 0.05$) than the animals of G3. Other lesions observed in the livers of these three groups were swollen, vacuolated or necrotic hepatocytes, mainly in the centrolobular region, and thickening of the Glisson's capsule with vacuolization and necrosis of subcapsular hepatocytes. These lesions were more pronounced in areas where exists higher infiltration of foamy macrophages. In cattle from G5 smaller groups of foamy macrophages were observed in the lymph nodes and were absent in the liver. These results suggest that the hepatic lesions observed in buffalo are caused by ingestion of *Brachiaria* spp. The presence of severe lesions in buffalo without clinical signs, much more severe than those observed and reported previously in cattle, as well as the low frequency of *Brachiaria* poisoning in buffalo grazing in *Brachiaria* spp. pastures, suggest that buffalo are resilient to *Brachiaria* spp. poisoning. In each group, there was no association between the weight at slaughter and the degree of lesion. It is also suggested that the observation of severe lesions of the liver,

¹ Recebido em 23 de fevereiro de 2010.

Aceito para publicação em 10 de abril de 2010.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus de Castanhal, Rua Maximino Porpino da

Silva 1000, Castanhal, PA, 68743-080, Brasil. *Autor para correspondência: griet@ufpa.br

³ Hospital Veterinário, Campus de Patos da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brasil.

similar to those observed in this experiment, in animal that died from other diseases, can lead to a wrong diagnosis of *Brachiaria* poisoning.

INDEX TERMS: Liver, lymph nodes, histologic changes, buffalo, *Brachiaria* spp., saponins, foamy macrophages.

RESUMO.- Infiltração por macrófagos espumosos e outras lesões podem ser encontradas em bovinos clinicamente saudáveis em pastagens de *Brachiaria* spp. Com o objetivo de determinar as alterações histológicas do fígado e linfonodos mesentéricos em búfalos no Pará foram estudadas as alterações histológicas de fragmentos desses órgãos de 142 búfalos da raça Murrah e de 15 bovinos da raça Nelore, coletados em frigoríficos. As coletas foram separadas em grupos de animais de acordo com sua origem e tempo de permanência na pastagem de *Brachiaria* spp., sendo o Grupo (G) 1 composto por 79 búfalos provenientes da Ilha de Marajó, criados em pastagens de campo nativo; o G2 composto por 17 búfalos mantidos desde o nascimento em pastagens de *Brachiaria brizantha*; o G3 composto por 29 búfalos adquiridos na Ilha do Marajó e introduzidos em pastagem de *B. decumbens* por aproximadamente 12 meses; o G4 composto por 17 búfalos adquiridos na Ilha de Marajó e introduzidos em pastagem de *B. brizantha* por aproximadamente 18 meses; e o G5 composto por 15 bovinos mantidos em pastagem de *B. brizantha* por aproximadamente 12 meses. Para avaliar a gravidade da lesão hepática foram estabelecidos graus de acordo com a quantidade e tamanho dos grupos de macrófagos espumosos, seguindo uma escala de 0 a 4. Nos animais do G1, provenientes da Ilha de Marajó, não foram observadas alterações histológicas significativas no fígado e linfonodos mesentéricos. Em todas as amostras dos grupos G2, G3 e G4 foram observadas quantidades variáveis de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos mesentéricos. Os animais dos grupos G2 e do G4, que permaneceram um período maior em pastagens de *Brachiaria* spp., apresentaram lesões mais acentuadas ($P < 0,05$) de macrófagos espumosos do que os animais do G3. Além da presença de macrófagos espumosos, foram observadas também, no fígado desses três grupos, tumefação, vacuolização e necrose de hepatócitos, principalmente da região centrolobular. Essas lesões eram mais acentuadas nas áreas onde havia maior infiltração de macrófagos espumosos. Havia fibrose capsular e as lesões dos hepatócitos nesta localização eram mais severas. Nos bovinos do G5 foram observados pequenos grupos de macrófagos espumosos nos linfonodos mesentéricos e ausência dessas células no fígado. Esses resultados sugerem que as lesões hepáticas observadas na histologia em búfalos sem sinais clínicos são ocasionadas pela ingestão de *Brachiaria* spp. A presença de lesões severas em búfalos sem sinais clínicos, bem mais graves do que as observadas em bovinos, assim como a ausência de surtos de intoxicação por *Brachiaria* nessa espécie, sugere sua resiliência à intoxicação por *Brachiaria* spp. Dentro de cada grupo não foi comprovada associação entre o peso ao abate e a gravidade das lesões. A presença de lesões severas no fígado de búfalos sem sinais clínicos alerta para o fato de

que lesões semelhantes encontradas durante necropsias de búfalos mortos por outras causas possam levar ao diagnóstico errado de intoxicação por *Brachiaria* spp.

TERMS DE INDEXAÇÃO: Fígado, linfonodo, alterações histológicas, búfalos, *Brachiaria* spp., saponinas, macrófagos espumosos.

INTRODUÇÃO

A intoxicação por *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola* afeta bovinos (Fagliari et al. 1993, Lemos et al. 1996 a 1997) ovinos (Lemos et al. 1996b, Brum et al. 2007) caprinos (Lemos et al. 1998, Silveira et al. 2009) e bubalinos (Rozza et al. 2004) e ocorre em qualquer época do ano. Os ovinos são mais suscetíveis do que os bovinos à intoxicação. Os animais jovens (cordeiros e bezeros) são mais suscetíveis do que os adultos (Riet-Correa & Méndez 2007). A intoxicação pode ocorrer, também, em animais lactentes, com menos de 30 dias de idade (Fagliari et al. 1983, Lemos et al. 1996a).

No Pará, *B. brizantha* é a pastagem mais utilizada para bovinos e bubalinos, seguida da *B. humidicola*. A intoxicação por *B. brizantha* nesse estado tem sido observada em bovinos (Barbosa 2009), ovinos (Albernaz et al. 2008) e caprinos (Silveira et al. 2009) e a intoxicação por *B. humidicola* foi relatada em eqüinos (Barbosa et al. 2006).

Tokamia & Langenegger (1983) em um estudo para averiguar uma doença de etiologia desconhecida em búfalos pastejando em *B. humidicola*, em Manaus, encontraram, na histopatologia do fígado vacuolização, tumefação e necrose de hepatócitos, e grande número de células tumefeitas, com citoplasma mais claro e espumoso (macrófagos espumosos), diagnosticando fotossensibilização hepatógena. Recentemente foi diagnosticado um caso de intoxicação por *B. brizantha* em um bubalino que apresentava sinais de encefalopatia hepática, caracterizados por depressão acentuada, permanência em decúbito esternal, paralisia da mandíbula, língua e pálpebras e cegueira. Na necropsia foi observado fígado aumentado de tamanho, com bordos arredondados e com acentuação do padrão lobular. Histologicamente o fígado apresentava grande quantidade de macrófagos espumosos distribuídos por todo o parênquima hepático, discreta proliferação de células de ductos e fibrose na região periportal. Havia, também, vacuolização da substância branca no tronco encefálico (Dados não publicados). Em materiais de bubalinos recebidos no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), que morreram de diversas causas, foi observado no fígado e linfonodos de todos os animais grande quantidade de macrófagos espumosos (G. Riet-Correa 2009, dados não publicados). No Rio Grande do Sul, Rozza et al. (2004) descrevem um caso de intoxicação por

B. decumbens em uma búfala em que as principais alterações histopatológicas do fígado consistiam de degeneração e necrose de hepatócitos, proliferação de ductos biliares, bilestase, e presença de cristais biorrefringentes no interior dos macrófagos, hepatócitos e ductos biliares.

Infiltração focal de macrófagos com citoplasma espumoso tem sido descrita em fígado e linfonodos de bovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria* spp. (Driemeier et al. 1998, Fioravanti 1999, Gomar et al. 2005, Moreira et al. 2009). Em bovinos, foi encontrada correlação negativa entre os ganhos de peso e o número de macrófagos espumosos no fígado de bovinos pastejando em *B. decumbens*, sugerindo que perdas econômicas importantes ocorrem em animais sem sinais clínicos pastejando essa gramínea (Fioravanti 1999). Emagrecimento progressivo e morte, após alguns meses, foram observados em bovinos mantidos em pastagens de *B. decumbens*, sem fotossensibilização. Nesse caso um animal necropsiado apresentava grande quantidade de macrófagos espumosos no fígado, baço, linfonodos mesentéricos e hepáticos e na submucosa do intestino delgado (Riet-Correa et al. 2002).

Considerando a importância da bubalinocultura para a região Norte do Brasil, assim como o fato de que as principais forrageiras introduzidas nesta região são diferentes espécies de braquiária é evidente a necessidade de estudar a intoxicação clínica e subclínica por esta gramínea em búfalos. Os objetivos desse trabalho foram: determinar as alterações histológicas do fígado e linfonodos mesentéricos em bubalinos no Pará; determinar se há associação entre a presença de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos e outras lesões histológicas do fígado com a ingestão de *Brachiaria* spp. e determinar se, em búfalos, as alterações hepáticas causadas pelas diferentes espécies de *Brachiaria* representam uma forma subclínica da intoxicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar este trabalho foram coletados fragmentos de fígado e linfonodos mesentéricos de 142 búfalos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah e de 15 bovinos da raça Nelore abatidos em frigoríficos localizados nos municípios de Belém e Castanhal, Pará. O material coletado foi processado para estudo histológico no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UFPA.

As coletas foram separadas em grupos de animais de acordo com sua origem e tempo de permanência em pastagem de *Brachiaria* spp. Após o abate buscaram-se informações junto aos proprietários dos animais para realização de questionário no qual se identificava a origem dos animais, tipo de pastagem em que estavam, tempo de permanência desses animais na pastagem, idade, e se havia algum histórico de doença de pele (fotossensibilização) na propriedade.

O Grupo 1 de coleta (G1) era composto por 79 animais, sem idade definida, provenientes de municípios localizados na Ilha de Marajó, onde foram criados em pastagens de campo nativo não tendo permanecido em pastagens de *Brachiaria* spp. O Grupo 2 (G2) era composto por 17 búfalos, com idade entre 3 e 4 anos, provenientes do município de Rondon do Pará, região Su-

deste do Pará. Esses animais foram criados desde o nascimento em uma propriedade que utilizava somente *Brachiaria brizantha* como alimentação. Os Grupos 3 e 4 (G3 e G4) foram adquiridos na Ilha do Marajó e introduzidos em campos com pastagem de *Brachiaria* spp localizados no continente. O G3 era composto por 29 búfalos, com idade entre 24 e 30 meses, mantidos em pastagem predominante de *B. decumbens* por aproximadamente 12 meses, em propriedade localizada no município de Ourém, região Nordeste do estado do Pará. O G4 era composto por 17 búfalos, mantidos em pastagem com predominância de *B. brizantha* por aproximadamente 18 meses, em propriedade localizada no município de Paragominas, região Sudeste do Estado. O G5 era composto por 15 bovinos com idade entre 34 e 36 meses, provenientes do município de Igarapé Açú, mantidos em pastagem de *B. brizantha* por aproximadamente 12 meses. Amostras desse grupo foram coletadas com o objetivo de comparar a gravidade das lesões hepáticas dos bovinos com as dos bubalinos.

Antes do abate eram inspecionados todos os animais para identificar lesões de fotossensibilização. Na linha de abate foram coletados fígado e linfonodos mesentéricos junto à mesa de inspeção veterinária e foi determinado o peso individual das carcaças.

O material coletado foi fixado em formal a 10%, embebido em parafina, cortado a 4-5 micrômetros de espessura, corados pela hematoxilina-eosina e avaliados em microscópio de luz. Para avaliar o grau de lesão hepática foram estabelecidos graus de acordo com a quantidade e tamanho dos grupos de macrófagos espumosos, seguindo uma escala de 0-4: grau 0 = ausência de macrófagos espumosos; grau 1 = de 1-70 grupos pequenos de macrófagos espumosos compostos por 3-10 células, podendo conter grupos de até 50 células; grau 2 = até 300 grupos pequenos de macrófagos espumosos dos quais a maior parte continham de 5-30 células, com alguns grupos de até 100 células, principalmente na região centrolobular; grau 3 = de 300-400 grupos de macrófagos espumosos, contendo de 10-30 células e alguns grupos com até 100 células, distribuídos pelo lóbulo; grau 4: grupos extensos de macrófagos espumosos, alguns com mais de 200 células, que começavam na região centrolobular e se estendiam até a região medlozonal, às vezes formando pontes entre as veias centrolobulares e infiltrando grande parte do lóbulo. Para a contagem foi utilizada uma lâmina histológica com um fragmento de fígado e outra com um fragmento de linfonodo para cada animal examinado. Para a contagem dos grupos de macrófagos no microscópio óptico foi utilizada objetiva de 10x e para contagem das células de cada grupo objetiva de 40x.

Para análise dos dados, foram geradas análises estatísticas usando o software Statistix 9.0. Foram usados os testes de Qui-quadrado para avaliação do grau de infiltração por macrófagos espumosos nos diferentes grupos e teste de Kruskal-Wallis para avaliação do peso no abate em relação ao grau de infiltração por macrófagos espumosos em cada grupo. Foram realizadas também distribuições de freqüências para os graus das lesões nos diferentes grupos.

Durante o período de março de 2008 a janeiro de 2010 foram acompanhados e estudados os casos de fotossensibilização em búfalos diagnosticados na Faculdade de Veterinária da UFPA.

RESULTADOS

Em nenhum dos grupos foram observadas lesões de fotossensibilização. Nos animais do G1, provenientes da Ilha

de Marajó, não foram observadas alterações histológicas significativas no fígado e linfonodos mesentéricos.

Em todas as amostras dos G2, G3 e G4 foram observados macrófagos espumosos no fígado (Fig.1 e 2) e linfonodos mesentéricos (Fig.3). Nos animais do G2 (nascidos e criados em *Brachiaria brizantha*) todos os animais tiveram algum grau de infiltração por macrófagos espumosos no fígado. Das 17 amostras três apresentaram grau 1, cinco grau 2, seis grau 3 e três grau 4, sendo observados grupos de macrófagos em todas as regiões do lóbulo. Os hepatócitos da região centrolobular estavam aumentados de volume, com citoplasma pálido e vacuolizado, membrana irregular e núcleo pequeno. Essas alterações eram mais acentuadas nos locais onde a infiltração de macrófagos era acentuada (grau 3 ou 4), podendo se estender por quase todo o lóbulo, restando apenas os hepatócitos próximos à região periportal sem alterações (Fig.2). Foi ob-

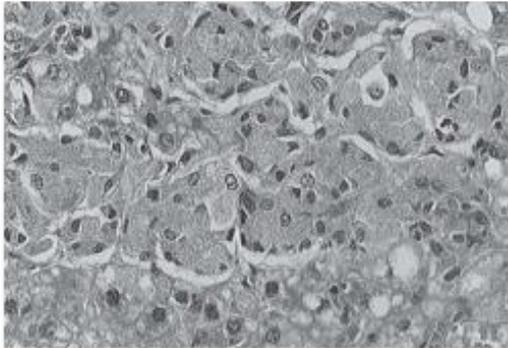


Fig.1. Grupo de macrófagos espumosos na região centrolobular do fígado de búfalo. Os hepatócitos adjacentes apresentam-se severamente vacuolizados. HE, obj.40x.

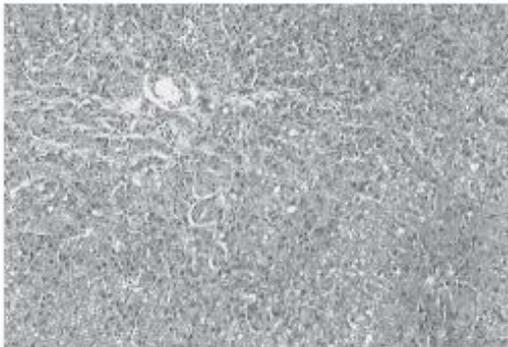


Fig.2. Grupos extensos de macrófagos espumosos infiltrando grande parte do lóbulo, no fígado de búfalo. Os hepatócitos apresentam-se tumefeitos, com citoplasma pálido e vacuolizado, membrana irregular e núcleo pequeno. HE, obj.40x.

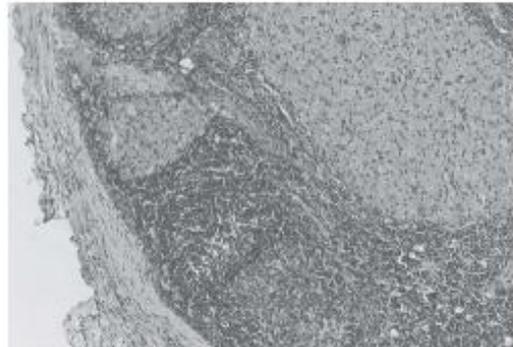


Fig.3. Grupos de numerosos macrófagos no córtex e medula de linfonodo de búfalo. HE, obj.40x.

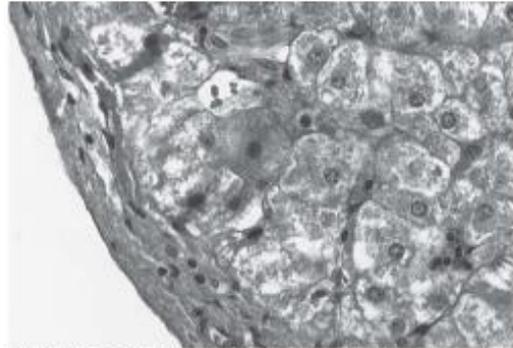


Fig.4. Espessamento da cápsula e severa vacuolização dos hepatócitos subcapsulares no fígado de búfalo. HE, obj.40x.

servada, também, necrose individual de hepatócitos, principalmente na região centrolobular, sendo mais evidente nas regiões onde havia vacuolização acentuada. Discretos infiltrados de células mononucleares, com raros neutrófilos, eram observados distribuídos aleatoriamente, em alguns lóbulos hepáticos. Todos os animais apresentaram espessamento da cápsula e vacuolização moderada a acentuada dos hepatócitos subcapsulares (Fig.4).

Nos linfonodos mesentéricos foi observada infiltração de macrófagos em todas as amostras. Em alguns animais, grandes grupos de macrófagos espumosos infiltravam a maior parte da região medular e alguns grupos eram observados na região cortical (Fig.3). Em outros a infiltração de macrófagos espumosos se estendia difusamente desde a região medular até a cortical, permanecendo apenas as áreas próximas a cápsula sem infiltração.

No fígado dos animais do G3 (12 meses em pastagem de *B. decumbens*) a infiltração por macrófagos espumosos variou de grau 1 a 3. Dos 29 animais, 18 apresentaram grau 1, nove grau 2 e dois grau 3. A infiltração afetava principalmente a região centrolobular e em menor grau a

Quadro 1. Número e percentual de animais de cada grupo de acordo com grau de lesão hepática discreta ou acentuada

Grupo	Permanência nas pastagens	Infiltração por macrófagos espumosos					
		G1(n)	G2(n)	G1+G2(%)	G3(n)	G4(n)	G3+ G4(%)
1	Criados em campo nativo	0	0	0	0	0	0
2	Criados em <i>B. brizantha</i>	3	5	7,1a*	6	3	52,9a
3	12 meses em <i>B. decumbens</i>	18	9	93,1b	2		6,9b
4	18 meses em <i>B. brizantha</i>	1	3	23,5a	9	4	76,5a

* Letras diferentes na mesma coluna significam valores estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

mediozonal. Somente em cinco amostras foi observada, também, discreta infiltração na região periportal. Foi observada tumefação discreta dos hepatócitos da região centrolobular em todas as amostras e necrose individual de alguns hepatócitos. Discretos infiltrados de células mononucleares, com raros neutrófilos, eram observados em alguns lóbulos hepáticos, distribuídos aleatoriamente. Todos os animais apresentaram leve espessamento da cápsula e discreta vacuolização dos hepatócitos subcapsulares. Nos linfonodos mesentéricos havia grandes grupos de macrófagos espumosos ocupando a maior parte da região medular. Na região cortical eram observados alguns grupos isolados de macrófagos espumosos.

No fígado dos animais do G4 (há 18 meses em pastagem de *B. brizantha*) a infiltração por macrófagos espumosos foi mais severa que a do G3. Dos 17 animais, um apresentava grau 1, três grau 2, nove grau 3 e quatro grau 4. A infiltração era moderada a acentuada nas regiões centrolobulares a mediozonais e discreta na região periportal. Os hepatócitos da região centrolobular estavam aumentados de volume, com citoplasma pálido e vacuolizado, membrana irregular e núcleo pequeno. Essas alterações eram mais acentuadas nos locais onde a infiltração de macrófagos era acentuada (grau 3 ou 4), podendo se estender por quase todo o lóbulo, restando apenas os hepatócitos próximos à região periportal sem alterações. Foi observada também, necrose individual de hepatócitos, principalmente na região centrolobular. A necrose de hepatócitos era mais evidente nas regiões onde havia vacuolização acentuada. Discretos infiltrados de células mononucleares, com raros neutrófilos, eram observados em alguns lóbulos hepáticos, distribuídos aleatoriamente. Todos os animais apresentaram espessamento da cápsula e moderada à acentuada vacuolização dos hepatócitos subcapsulares. Nos linfonodos mesentéricos a infiltração de macrófagos foi observada em todas as amostras. Em alguns animais grandes grupos de macrófagos espumosos infiltravam a maior parte da região medular e alguns grupos eram observados na região cortical. Em outros a infiltração de macrófagos espumosos se estendia difusamente desde a região medular até a cortical, permanecendo apenas as áreas próximas a cápsula sem infiltração.

Os animais do G2 e do G4, que permaneceram um período maior em pastagens de *Brachiaria* spp., apresentaram lesões mais acentuadas de macrófagos espumosos do que os animais do G3. Quando agrupados os graus

de macrófagos espumosos em lesões discretas (graus 1 e 2) e acentuadas (graus 3 e 4) houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos G2 e G3 e G4 e G3, enquanto que entre os grupos G2 e G4 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Quadro 1).

Nos animais do G5 (bovinos mantidos em *B. brizantha* durante aproximadamente 12 meses) foram observados pequenos grupos de macrófagos espumosos nos linfonodos mesentéricos e ausência dessas células no fígado.

Não foi encontrada nos animais dos G2, G3 e G4 diferença significativa entre os graus de lesão de macrófagos espumosos e o peso dos animais ao abate dentro de cada grupo, não sendo observado, portanto, relação entre a presença de macrófagos espumosos e o peso nos animais.

Durante o período de março de 2008 a janeiro de 2010 foi observado apenas um caso de fotossensibilização em bubalinos na área de influência da Faculdade de Veterinária da UFPA. De um lote de 60 animais trazidos da Ilha de Marajó e introduzidos em uma pastagem de *B. humidicola*, no município de Mojú, um apresentou lesões graves de fotossensibilização cinco meses após a introdução na pastagem.

DISCUSSÃO

Foi observada grande quantidade de macrófagos espumosos e outras lesões no fígado e linfonodos mesentéricos dos bubalinos dos G2, G3 e G4, mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. Essas lesões não foram observadas nos bubalinos do G1, mantidos em campos nativos da Ilha de Marajó, criados sem ingerir *Brachiaria* spp. Esses resultados sugerem que as lesões hepáticas observadas são ocasionadas pela ingestão de *Brachiaria* spp. Resultados semelhantes foram relatados por Driemeier et al. (1999), que determinaram, pela primeira vez, a relação entre o consumo de *Brachiaria* spp. e a presença de macrófagos espumosos no fígado e linfonodos de bovinos abatidos em frigorífico. A presença destes macrófagos espumosos está associada às saponinas litogênicas contidas nas pastagens, o que é evidenciado pela presença de cristais dentro dos macrófagos (Lemos et al. 1998, Driemeier et al. 1998). Moreira et al. (2009a) encontraram macrófagos espumosos no fígado e gânglios de bovinos alimentados por *Andropogon gayanus*, planta que também contém saponinas litogênicas (Castro et al. 2009, Moreira et al. 2009b).

Os animais do G2 e do G4, que permaneceram um período maior em pastagens de *Brachiaria* spp., apresentaram

lesões mais acentuadas do que os animais do G3. Achado semelhante foi relatado por Silva (1989) que observou a presença, ainda que incipiente, de células espumosas no fígado de bovinos jovens de 5 a 8 meses, sem sinais de fotossensibilização, enquanto que nos animais mais velhos estas células eram mais evidentes e mais frequentes.

Macrófagos espumosos e outras lesões (tumefação, vacuolização e/ou necrose de hepatócitos e fibrose periportal) semelhantes às observadas neste trabalho são observadas em bovinos abatidos procedentes de pastagens de *Brachiaria* spp. (Driemeier et al. 1998, Fioravante 1999, Gomar et al. 2005, Moreira et al. 2009). No entanto, pelas descrições desses autores, as lesões em búfalos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. são bem mais graves do que as observadas em bovinos. Isto é sugerido, também, pela observação de lesões bem menos marcadas no grupo de 15 bovinos (G5) procedentes também de pastagens de *Brachiaria* spp. Por outro lado, o fato de existirem poucos relatos de fotossensibilização em bubalinos mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp. indica que esta espécie, apesar de ser sensível à intoxicação por essas gramíneas, é aparentemente mais resistente à intoxicação do que os bovinos, pois raramente apresentam a forma clínica da intoxicação. Talvez essas lesões encontradas no abate, bem mais graves do que as observadas em bovinos, indiquem que esses animais se intoxicam (evidenciado pelas lesões hepáticas), mas não manifestam sinais clínicos podendo ser definidos como animais resilientes. Em bovinos a presença de macrófagos espumosos não tem sido correlacionada com a toxicidade de *Brachiaria* spp., podendo ser uma consequência da ingestão por tempo longo de saponinas litogênicas, sem necessariamente estar associados à quantidade de saponinas ingeridas. No entanto, outras lesões como vacuolização, tumefação e necrose de hepatócitos, têm sido descritas com frequência, associadas a casos clínicos de intoxicação (Tokamia & Langenegger 1983, Button et al. 1987, Alessi et al. 1994, Lemos et al. 1996a,b, 1997, 1998, 2009, Santos Jr 2008, Castro et al. 2009, Mustafa 2009).

Tokamia & Langenegger (1983) encontraram grande quantidade de macrófagos espumosos, vacuolização, necrose e tumefação de hepatócitos no fígado de búfalos com fotossensibilização mantidos em pastagens de *B. humidicola*. Após a observação das lâminas desse caso, verificou-se que as lesões foram semelhantes às encontradas nos bubalinos do presente estudo que apresentavam lesões de grau 4. Lesões semelhantes são descritas em um caso de intoxicação por *B. decumbens* em búfalos no Rio Grande do Sul (Rozza et al. 2004). No presente trabalho, apesar de muitos animais apresentarem lesões acentuadas, semelhantes às descritas por esses autores, nenhum apresentava sinais clínicos de fotossensibilização. A presença de lesões histológicas hepáticas relativamente graves, sem sinais clínicos, chama a atenção para a possibilidade de que em búfalos mortos por outras causas essas lesões sejam interpretadas como a causa da morte, levando a um diagnóstico errôneo de intoxicação por *Brachiaria* spp.

Em bovinos foi encontrada uma correlação negativa entre ganho de peso e o número de macrófagos espumosos em fígados de bovinos pastejando em *B. decumbens*, sugerindo que perdas econômicas importantes ocorreriam em animais sem sinais clínicos (Fioravante 1999, Moreira et al. 2009a). Fagliari et al. (1993) descrevem também uma forma subclínica da doença. Embora no presente estudo não tenha sido observado relação entre o peso dos animais ao abate e a quantidade de macrófagos espumosos no fígado, não é possível descartar que essas lesões ocasionem menores ganhos de peso, constituindo uma forma subclínica da doença. Novos estudos são necessários para determinar a possível interferência destas lesões no ganho de peso de búfalos, assim como a resistência/susceptibilidade dos bubalinos à intoxicação por *Brachiaria* spp. quando comparado com outras espécies.

Agradecimentos- Trabalho financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Para o Controle das Intoxicações por Plantas (Proc. CNPq nº 573534/2008-2. Os autores agradecem ao Professor Carlos Tokamia pela disponibilização de lâminas histológicas de um caso de fotossensibilização em búfalos.

REFERENCIAS

- Alessi A.C., Fagliari J.J., Okuda H.T. & Passipieri M. 1994. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. 4-Lesões hepáticas. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 46(4):319-328.
- Albernaz T.T., Silveira J.A.S., Reis A.B., Oliveira C.H.S., Oliveira C.M.C., Duarte M.D., Cerqueira V.D., Riet-Correa G. & Barbosa Neto J.D. 2008. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no Pará. Anais Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, MS, p.73-74.
- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Tokamia C.H. & Peixoto P.V. 2006. Fotossensibilização hepática em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. Pesq. Vet. Bras. 26:147-153.
- Barbosa J.D. 2009. Comunicação pessoal (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Rua Maximino Porpino da Silva 1000, Castanhal, PA 68743-080).
- Brum K.B., Haraguchi M., Lemos R.A.A., Riet-Correa F. & Fioravante M.C. 2007. Crystal associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. Pesq. Vet. Bras. 27:39-42.
- Button C., Paynter D.I., Shiel M.J., Colson A.R., Paterson P.J. & Lyford R. L. 1987. Crystal-associated cholangiohepatopathy and photosensitization in lambs. Aust. Vet. J. 64(6):176-80.
- 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. 2009. *Brachiaria* spp. poisoning in sheep in Brazil: Experimental and epidemiological findings. 8th International Symposium on Poisonous Plants, João Pessoa, Paraíba, Brazil, p.12. (Abstract)
- Driemeier D., Barros S.S., Peixoto P.V., Tokamia C.H., Döbereiner J. & Brito M.F. 1998. Estudo histológico, histoquímico e ultra-estrutural de fígados e linfonodos de bovinos com presença de macrófagos espumosos ("foam cells"). Pesq. Vet. Bras. 18:29-34.
- Driemeier D., Döbereiner J., Peixoto P.V. & Brito M.F. 1999. Relação entre macrófagos espumosos ("foam cells") no fígado de bovinos e ingestão de *Brachiaria* spp no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 19:79-83.
- Fagliari J.J., Passipieri M. & Oliveira J.A. 1983. Sintomas de fotossen-

- sibilidade em bezerros alimentados com leite materno. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 35(4):479-484.
- Fagliari J.J., Passipieri M., Kuchembuck M.R.G. & Curi P.R. 1993. Intoxicação natural de bovinos pela micotoxina esporidesmina. II. Aspectos clínicos. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 45(3):275-282.
- Fioravanti M.C. 1999. Incidência, avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP. 256p.
- Gomar M.S., Driemeier D., Colodel E.M. & Gimeno E.J. 2005. Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* spp. J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med. 52:18-21.
- Lemos R.A.A., Osório A.L.A.R., Rangel J.M.R. & Herrero J.R.G.O. 1996a. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em bezerros ingerindo *Brachiaria brizantha*. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 63(Supl.):22.
- Lemos R.A.A., Ferreira L.C.L., Silva S.M., Nakazato L. & Salvador S.C. 1996b. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. Ciência Rural 26:109-113.
- Lemos R.A.A., Salvador S.C. & Nakazato L. 1997. Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. Vet. Human Toxicol. 39:376-377.
- Lemos R.A.A., Nakazato L., Herrero J.R.G.O., Silveira A.C. & Porfírio L.C. 1998. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. Ciência Rural 28:507-510.
- Lemos R.A.A., Nogueira A.P.A., Souza R.I.C., Santos B.S., Carvalho N.M., Aniz A.C.M. & Freitas P.C. 2009. *Brachiaria* spp. poisoning in ruminants in Mato Grosso do Sul, Brazil. 8th International Symposium on Poisonous Plants, João Pessoa, Paraíba, Brazil, p.98. (Abstracts)
- Moreira C.N., Moraes M., Garcia E.C., Neto S.C., Araújo E.G. & Fioravanti M.C.S. 2009a. Bovinos alimentados com *Brachiaria* spp e *Andropogon gayanus*: alterações histológicas dos fígados e linfonodos. Ciênc. Anim. Bras. 10(1):206-218.
- Moreira C.N., Banyas V.L., Pinto A.S., Franco L.A.S., Haraguchi M. & Fioravanti M.C.S. 2009b. Bovinos alimentados com capim *Brachiaria* e *Andropogon*: desempenho, avaliação da quantidade de esporos do fungo *Pithomyces chartarum* e teor de saponinas nas pastagens. Ciênc. Anim. Bras. 10(1):184-194.
- Mustafa V.S. 2009. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil central. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal. Brasília, DF. 71p.
- Riet-Correa F. & Méndez M.C. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas, p.99-219. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.2. Editora Pallotti, Santa Maria, RS.
- Riet-Correa G., Riet-Correa F., Schild A.L. & Driemeier D. 2002. Wasting and death in cattle associated with chronic grazing of *Brachiaria decumbens*. Vet. Hum. Toxicol. 44(3):179-180.
- Rozza D.B., Seitz A.L., Bandarra P.M., Santos E.O. & Driemeier D. 2004. Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em búfalo. Pesq. Vet. Bras. 24(Supl.):55-56.
- Santos Jr H.L. 2006. Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento de *Brachiaria decumbens* em ovinos. Brasília. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, DF. 70p.
- Silva L.B. 1989. Alterações hepáticas em bovinos acometidos de doença periodontal (cara inchada). Tese de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 27p.
- Silveira J.A.S., Albernaz T.T., Silva e Silva N., Lopes C.T.A., Cerqueira V.D., Oliveira C.M.C.H., Duarte M.D. & Barbosa J.D. 2009. Fotossensibilização hepatogênica em caprinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. Ciênc. Anim. Bras. 1(Supl.): 338-441.
- Tokarnia C.H. & Langenegger J. 1983. Relatório de viagem. 9p. (Datilografado)