



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Contribuição para o Estudo das  
Micotoxicoses dos Bovinos nas Ilhas de São  
Miguel e Terceira**

**Clara Sofia Madruga Dias**

Orientador: Professor Doutor Helder Carola Espiguinha Cortes

Orientador Externo: Doutor Carlos Augusto Pinto

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

Évora, 2015



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Contribuição para o Estudo das  
Micotoxicoses dos Bovinos nas Ilhas de São  
Miguel e Terceira**

**Clara Sofia Madruga Dias**

Orientador: Professor Doutor Helder Carola Espiguiha Cortes

Orientador Externo: Doutor Carlos Augusto Pinto

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

Évora, 2015

*Aos meus pais.*

*À memória do meu avô Chico e da minha tia Maria Teresa.*

## Agradecimentos

---

Ao Professor Helder Cortes, pela sua ajuda na realização deste estágio tão desejado nos Açores, pela sua ajuda na elaboração deste trabalho e por todos os conselhos, que com certeza, me acompanharão na vida.

Ao Professor Carlos Pinto, pelo seu entusiasmo e partilha de conhecimentos e ensinamentos, por acreditar em mim e no meu trabalho e principalmente por me ter recebido e tratado de uma forma tão carinhosa e paternal.

À Professora Elisa Bettencourt, pela sua disponibilidade e vontade constante de prestar ajuda.

À Professora Sandra Branco, pela sua ajuda preciosa em assuntos fulcrais deste trabalho e pelas sugestões importantes que partilhou comigo.

Ao Professor José Castro, pela sua tão importante ajuda num assunto mais complicado e pela sua motivação incessante que ajudam a seguir em frente.

À Isabel Neto Almeida, por ser uma pessoa maravilhosa, que tal como o Professor Carlos me abriu a porta de sua casa. Na sua presença senti-me sempre protegida, acolhida e amada.

Aos veterinários e restante pessoal do matadouro de S. Miguel: Dr. Manuel Leitão, Dr.<sup>a</sup> Andreia Medeiros, Dr. André Medeiros, Dr. Duarte Amorim, Dr. José Paulo, Senhor Mário Carvalho e Dona Natividade Melo, que tudo fizeram para que dispusesse do necessário para desenvolver o estágio.

Ao Senhor Dinarte, pela sua simpatia, boa disposição e boleia sempre que foi necessário.

Ao Dr. Helder Dinis, por me ter mostrado locais tão belos e por me ter ensinado e permitido a realização, pela primeira vez, de muitos procedimentos, com conselhos e ajuda nos momentos ideais. Às restantes pessoas da Associação Agrícola de S. Miguel.

Aos meus amigos da residência das Laranjeiras em S. Miguel: Emanuel, Andreia, Dalila, Bárbara, Omar, Divo, Pedro. Permitiram a vivência de momentos muito felizes que nos uniram.

À Eng.<sup>a</sup> Valentina Santos, por todos os ensinamentos micológicos, por ter permitido a minha participação nas atividades realizadas, por ter partilhado comigo os seus dados e pela sua amizade. Às Fátimas pela sua disponibilidade, ajuda e simpatia.

À Dr.<sup>a</sup> Susana Bernardo e pessoal do departamento de patologia, pela ajuda na preparação das lâminas, pela disponibilidade e simpatia. Às restantes pessoas do Laboratório Regional de Veterinária, Terceira.

Ao Dr. João Fagundes, pelos seus ensinamentos na prática clínica, ao Dr. Mário Silveira, Dr. Pedro Garcia, Dr.<sup>a</sup> Marlene Ribeiro e Dr. Tiago Oliveira, ao Senhor Alberto e restantes pessoas da UNICOL pela sua disponibilidade e ajuda.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Cota, Dr.<sup>a</sup> Vanda Dias, Dr.<sup>a</sup> Ana Luísa Homem, ao Senhor Bruno e à Dona Zézinha do Matadouro da Ilha Terceira, pela ajuda durante o estágio no matadouro, pela ajuda na busca dos dados, e em particular à Dr.<sup>a</sup> Paula pela boleia.

À Ana Seatra, pela companhia durante a estadia na Ilha Terceira, pelas horas bem passadas e por todos os momentos de partilha e amizade.

À Ivone Valadão e à sua família, pelo seu convite em 2010 para conhecer esta terra que se enraizou em mim, pela sua disponibilidade, ajuda e amizade incessantes.

Ao corpo clínico da Clínica Aqui Há Gato, por me terem permitido aprender tantas coisas, desanuviando do *stress* da tese.

Aos meus colegas e amigos da Universidade de Évora: João Lourenço, Daniela Martins, Joana Tavares, Mónica Ribeiro, Andreia Farinha e Jorge Oliveira, por me terem acompanhado ao longo de todo o curso, uma jornada longa mas maravilhosa vivida ao vosso lado.

Aos meus amigos de sempre: Alberto Martins, Ana Fonseca, Patrícia Pereira, Juliana Pisco, ainda que muitas vezes longe, a amizade sempre superou a distância. De forma especial à Ana pela sua ajuda e paciência.

Aos meus amigos de quatro patas: Carola, Aki, Lia, Chlôe, Bebê, Macaca, Simão, Romão, Azeitona e Tronco, pelo amor incondicional que partilham no gesto mais simples.

À minha família, por me ter acompanhado em cada trilha desta caminhada e amparado sempre que necessário.

Ao Orlando, por me apoiar no meu trajeto profissional, por estar a meu lado em cada decisão e por me aconselhar com amor.

Aos meus pais, por permitirem a realização dos meus sonhos, pelo amparo nos momentos difíceis e pela confiança que sempre depositaram em mim.

## Resumo

---

As micotoxicoses com maior expressão no arquipélago dos Açores são: a pitomicotoxicose, a aflatoxicose e o ergotismo. A escolha do tema de estudo recaiu sobre a pitomicotoxicose pela sua importância na produção agropecuária e consequente importância económica.

A pitomicotoxicose ou eczema facial, como é vulgarmente conhecida, é uma micotoxicose provocada pela esporidesmina, micotoxina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum*. A esporidesmina ao ser ingerida provoca lesões hepatobiliares, tendo os animais onde estas são mais graves maior probabilidade de desenvolver fotossensibilidade secundária.

A identificação de pitomicotoxicose nos Açores remonta ao início do milénio, tendo a partir desse momento sido criadas estratégias de monitorização e prevenção do desenvolvimento da doença.

Nesta investigação desenvolveram-se dois estudos, nas Ilhas de S. Miguel e Terceira, um de cariz retrospectivo, sobre os bovinos que entraram nos matadouros com lesões agudas ou crónicas de fotossensibilidade, e outro pela avaliação presencial dos fígados de fêmeas paridas abatidas durante o período de estágio, de modo a relacionar os casos de fotossensibilidade e as lesões hepáticas com a ação da esporidesmina.

Palavras-chave: Pitomicotoxicose, Esporidesmina, Bovinos, Açores.

## Abstract – Contribution to the Study of Mycotoxicosis of Cattle in São Miguel and Terceira Islands

---

Mycotoxicosis with higher expression in Azores archipelago are: pithomycotoxicosis, aflatoxicosis and ergotism. The choice of the study theme fell on the pithomycotoxicosis because of the major role in the agriculture and animal production and therefore economic importance.

The pithomycotoxicosis, commonly known as facial eczema, is a mycotoxicosis caused by sporidesmin, a mycotoxin produced by *Pithomyces chartarum*. When sporidesmin is ingested causes liver and bile duct damage, and those animals with most severe lesions are more prone to develop secondary photosensitivity.

The identification of pithomycotoxicosis in Azores dates back to the beginning of the millennium, and since that moment have been created monitoring and prevention efforts to control the disease.

This research have developed two studies, on the Islands of São Miguel and Terceira, a retrospective nature on cattle that entered the slaughterhouse with acute or chronic photosensitivity injuries, and the other one by the evaluation of the liver of calved females slaughtered during the probationary period in order to relate the cases of photosensitivity and liver damage with the action of sporidesmin.

Key Words: Pithomycotoxicosis, Sporidesmin, Cattle, Azores.

# Índice

---

1.Introdução.....	- 1 -
1.1.Micotoxicoses .....	- 1 -
1.1.1.Aflatoxicose.....	- 4 -
1.1.2.Ergotismo .....	- 6 -
1.1.3.Pitomicotoxicose – Eczema facial (EF).....	- 8 -
1.1.3.1.Etiologia .....	- 10 -
1.1.3.1.1.Morfologia e ciclo de vida do fungo <i>Pithomyces chartarum</i> .....	- 10 -
1.1.3.1.2.Esporidesmina .....	- 11 -
1.1.3.2.Condições para o desenvolvimento do ciclo de vida de <i>P. chartarum</i> .....	- 14 -
1.1.3.2.1.Substrato.....	- 15 -
1.1.3.2.2.Temperatura e humidade .....	- 16 -
1.1.3.3.Dinâmica dos esporos e esporidesmina na pastagem .....	- 17 -
1.1.3.4.Identificação e previsão da toxicidade da pastagem .....	- 17 -
1.1.3.4.1.Monitorização das condições meteorológicas.....	- 20 -
1.1.3.4.2.Monitorização do número de esporos .....	- 20 -
1.1.3.4.2.1.Método de contagem de esporos - “Método de Lavagem”.....	- 21 -
1.1.3.4.2.1.1.Colheita de amostras.....	- 22 -
1.1.3.4.2.1.2.Material .....	- 22 -
1.1.3.4.2.1.3.Descrição.....	- 23 -
1.1.3.4.3.Mensuração da esporidesmina da pastagem.....	- 23 -
1.1.3.5.Epidemiologia .....	- 24 -
1.1.3.5.1.Bovinos .....	- 26 -
1.1.3.5.2.Ovinos .....	- 26 -
1.1.3.5.3.Caprinos.....	- 27 -
1.1.3.5.4.Animais de laboratório .....	- 27 -
1.1.3.6.Patogenia .....	- 27 -
1.1.3.7.Sinaiis clínicos.....	- 31 -
1.1.3.7.1.Fase inicial .....	- 32 -
1.1.3.7.2.Fase dermatológica .....	- 33 -

1.1.3.7.3.Evolução .....	- 34 -
1.1.3.8.Diagnóstico .....	- 35 -
1.1.3.8.1.Avaliação macroscópica <i>post mortem</i> do fígado .....	- 35 -
1.1.3.8.2.Enzimas hepáticas .....	- 36 -
1.1.3.9.Diagnóstico diferencial .....	- 39 -
1.1.3.10.Lesões anatomopatológicas .....	- 43 -
1.1.3.10.1.Lesões macroscópicas .....	- 43 -
1.1.3.10.2.Lesões microscópicas .....	- 44 -
1.1.3.11.Tratamento .....	- 45 -
1.1.3.12.Prognóstico .....	- 46 -
1.1.3.13.Controlo e prevenção .....	- 47 -
1.1.3.13.1.Fungicidas .....	- 47 -
1.1.3.13.2.Controlo biológico por competição com estirpes não tóxicas .....	- 48 -
1.1.3.13.3.Espécies de plantas forrageiras alternativas .....	- 49 -
1.1.3.13.4.Maneio de pastagens .....	- 49 -
1.1.3.13.5.Suplementação .....	- 50 -
1.1.3.13.6.Imunização contra a esporidemia .....	- 50 -
1.1.3.13.7.Profilaxia com antioxidantes .....	- 50 -
1.1.3.13.8.Profilaxia com zinco .....	- 51 -
1.1.3.13.9.Seleção genética .....	- 57 -
1.1.3.13.9.1 Genética quantitativa .....	- 58 -
1.1.3.13.9.2.Pitomicotoxicose e parâmetros de produtividade .....	- 60 -
1.1.3.13.9.3.Resistência à pitomicotoxicose e outras a micotoxinas .....	- 60 -
1.1.3.13.9.4.Estudos de ADN .....	- 60 -
1.1.3.13.9.5. Associações bioquímicas com a resistência à pitomicotoxicose .....	- 62 -
1.1.3.13.9.6. Biologia molecular .....	- 62 -
1.1.3.13.9.7.Genes candidatos .....	- 63 -
2.Objetivos .....	- 64 -
3.Materiais e métodos .....	- 66 -
3.1.Estudo retrospectivo .....	- 66 -

3.2. Estudo no matadouro .....	- 66 -
4. Resultados.....	- 71 -
4.1. Estudo retrospectivo.....	- 71 -
4.1.1. Ilha de S. Miguel .....	- 71 -
4.1.2. Ilha Terceira .....	- 75 -
4.2. Estudo no matadouro .....	- 82 -
4.2.1. Ilha de S. Miguel .....	- 82 -
4.2.2. Ilha Terceira .....	- 90 -
4.2.3. Análise histopatológica .....	- 97 -
5. Discussão .....	- 101 -
5.1. Estudo retrospectivo.....	- 101 -
5.1.1. Ilha de S. Miguel .....	- 101 -
5.1.2. Ilha Terceira .....	- 102 -
5.2. Estudo no matadouro .....	- 104 -
5.2.1. Ilha de S. Miguel .....	- 104 -
5.2.2. Ilha Terceira .....	- 107 -
5.2.3. Análise histopatológica .....	- 109 -
6. Conclusões.....	- 109 -
7. Bibliografia.....	- 111 -

## Índice de Gráficos

---

Gráfico 1: Relação entre o crescimento da erva da pastagem e o desenvolvimento de <i>Pithomyces chartarum</i> na Nova Zelândia (Brook, 1969) .....	- 19 -
Gráfico 2: Frequência de animais com FTS, HPQ ou ambas durante os anos estudados ....	- 71 -
Gráfico 3: Distribuição do número de casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos anos estudados. ....	- 72 -
Gráfico 4: Distribuição acumulada dos anos estudados dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos meses. ....	- 73 -
Gráfico 5: Distribuição das causas de rejeição hepática de todos os animais com FTS, HPQ ou ambas.....	- 74 -
Gráfico 6: Distribuição, em percentagem, da aprovação e causas de rejeição das carcaças rejeitadas <i>ante e post mortem</i> .....	- 75 -
Gráfico 7: Frequência de animais com FTS, HPQ ou ambas durante os anos estudados ....	- 76 -
Gráfico 8: Distribuição do número de casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos anos estudados. ....	- 77 -
Gráfico 9: Distribuição acumulada dos anos estudados dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos meses.....	- 77 -
Gráfico 10: Distribuição das causas de rejeição hepática de todos os animais com FTS, HPQ ou ambas.....	- 78 -
Gráfico 11: Distribuição, em percentagem, da aprovação e causas de rejeição das carcaças rejeitadas <i>ante e post mortem</i> .....	- 79 -
Gráfico 12: Contagem máxima de esporos das pastagens em cada mês, de quatro locais da Ilha Terceira, referentes aos anos entre 2001 e 2014. ....	- 80 -
Gráfico 13: Distribuição do número de consultas realizadas a animais com FTS pela equipa veterinária da UNICOL e número de casos no matadouro da Ilha Terceira com FTS, entre o ano de 2004 e 2014, e entre 2005 e 2014, respetivamente. ....	- 81 -
Gráfico 14: Histograma com a distribuição das idades da amostra e a sobreposição da distribuição de Gauss.....	- 82 -
Gráfico 15: Distribuição, em percentagem, das alterações na inspeção <i>ante mortem</i> . ....	- 84 -
Gráfico 16: Histograma com a distribuição do log <sub>10</sub> (Peso da carcaça quente) com sobreposição da distribuição de Gauss.....	- 85 -
Gráfico 17: Distribuição, em percentagem, da conformação SEUROP das carcaças observadas .....	- 86 -
Gráfico 18: Distribuição, em percentagem, da gordura da carcaça.....	- 86 -
Gráfico 19: Resultados da inspeção das carcaças e suas frequências relativas. ....	- 87 -
Gráfico 20: Distribuição, em percentagem, das diversas classificações e causas resultantes da avaliação das carcaças.....	- 88 -

Gráfico 21: Distribuição percentual da avaliação das vísceras (fígado, pulmão, coração, rins, diafragma, língua e rabo) após inspeção sanitária. ....	- 88 -
Gráfico 22: Distribuição, em percentagem, das causas de rejeição hepática indicada pelo matadouro. ....	- 89 -
Gráfico 23: Distribuição, em percentagem, dos fígados sem F/E e dos graus de F/E apresentados pelos restantes fígados. ....	- 90 -
Gráfico 24: Distribuição logaritmizada da idade, com sobreposição da distribuição de Gauss. ....	- 90 -
Gráfico 25: Distribuição, em percentagem, das alterações na inspeção <i>ante mortem</i> . ....	- 91 -
Gráfico 26: Histograma com a distribuição do log <sub>10</sub> (Peso da carcaça quente) com sobreposição da distribuição de Gauss. ....	- 92 -
Gráfico 27: Distribuição, em percentagem, da conformação SEUROP das carcaças observadas. ....	- 93 -
Gráfico 28: Distribuição, em percentagem, da gordura da carcaça. ....	- 93 -
Gráfico 29: Distribuição, em percentagem, das diversas classificações resultantes da avaliação das carcaças. ....	- 94 -
Gráfico 30: Causas de rejeição das carcaças e suas frequências relativas. ....	- 94 -
Gráfico 31: Distribuição percentual da avaliação das vísceras (fígado, pulmão, coração, rins, diafragma, língua e rabo) após inspeção sanitária. ....	- 95 -
Gráfico 32: Distribuição, em percentagem, das causas de rejeição hepática indicada pelo matadouro. ....	- 96 -
Gráfico 33: Distribuição, em percentagem, dos fígados sem F/E e dos graus de F/E apresentados pelos restantes fígados. ....	- 96 -

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1: Algumas das micotoxinas e micotoxicoses mais relevantes em animais de produção.....	- 2 -
Tabela 2: Limites máximos da presença de aflatoxina B <sub>1</sub> na alimentação de ruminantes na Comunidade Europeia (Diretiva 2002/32/EC, 2002; FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004)	- 6 -
Tabela 3: Limite máximo da presença de aflatoxinas M <sub>1</sub> no leite e derivados para alimentação humana na Comunidade Europeia (FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004; Commission Regulation 1881/2006, 2006)	- 6 -
Tabela 4: Atividade química e biológica das esporidesminas (adaptado de Bonnefoi & Sauvagnac, 1988)	- 12 -
Tabela 5: Número de esporos/g de erva seca a que corresponde cada número da Figura 7 (adaptado de Brook, 1963)	- 19 -
Tabela 6: Classificação do risco de aparecimento de pitomicotoxicose consoante as contagens de esporos da pastagem e das fezes (adaptado de Mulvaney, 2011 referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013)	- 21 -
Tabela 7: Descrição do método original de contagem de esporos e suas atualizações	- 23 -
Tabela 8: Correlação entre os níveis de GGT, o grau de lesão hepática e quebra de produção leiteira em bovinos (adaptado de Faull, 1991 e Parkinson <i>et al.</i> , 2010 referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013)	- 38 -
Tabela 9: Agentes fotodinâmicos responsáveis por fotossensibilidade primária em ruminantes	- 41 -
Tabela 10: Plantas e bactérias implicadas na FTS secundária	- 42 -
Tabela 11: Fungos e suas micotoxinas implicados na FTS secundária	- 43 -
Tabela 12: Ensaio com as linhas de seleção da raça ovina Romney, (Phua <i>et al.</i> , 2014b)	- 61 -
Tabela 13: Informação sobre os estudos retrospectivos.	- 66 -
Tabela 14: Informação sobre os estudos em matadouro.	- 67 -
Tabela 15: Descrição das alterações macroscópicas compatíveis com pitomicotoxicose e a sua categorização em quatro graus	- 68 -
Tabela 16: Ano, número de bovinos abatidos por ano, número de bovinos abatidos com FTS e/ou HPQ por ano, frequência anual de bovinos abatidos com FTS e/ou HPQ	- 71 -
Tabela 17: Distribuição do número total de animais, de animais rejeitados <i>ante e post mortem</i> , dos fígados aprovados e rejeitados e das três causas de rejeição hepática mais frequentes por cada tipo de inspeção <i>ante mortem</i>	- 74 -
Tabela 18: Ano, número de bovinos abatidos por ano, número de bovino abatidos com FTS e/ou HPQ por ano, frequência anual de bovinos abatido com FTS e/ou HPQ	- 76 -

Tabela 19: Distribuição do número total de animais, de animais rejeitados <i>ante e post mortem</i> , dos fígados aprovados e rejeitados e das três causas de rejeição hepática mais frequentes por cada tipo de inspeção <i>ante mortem</i> .....	- 78 -
Tabela 20: Médias e desvios padrão das idades (meses) dos subgrupos estudados .....	- 83 -
Tabela 21: Médias e desvios padrão dos pesos (Kg) dos subgrupos estudados .....	- 85 -
Tabela 22: Taxa de aprovação e reprovação das carcaças dos subgrupos estudados e principal causa de rejeição de carcaças em cada subgrupo .....	- 87 -
Tabela 23: Médias e desvios padrão das idades (meses) dos subgrupos estudados .....	- 91 -
Tabela 24: Médias e desvios padrão dos pesos (Kg) dos subgrupos estudados .....	- 92 -
Tabela 25: Graus de lesão hepática macroscópica e alterações histopatológicas respectivas-	- 97 -

---

## Índice de Figuras

---

Figura 1: Estrutura da aflatoxina B <sub>1</sub> representativa das restantes aflatoxinas (Richard, 2007).	- 4 -
Figura 2: Estrutura da ergotamina H, representativa dos restantes ergot alcalóides (Richard, 2007).	- 6 -
Figura 3: <i>Pithomyces chartarum</i> . A) Conídios e micélio. B) Conidióforo com anel dilatado e de parede fina na base do conídio. C) Micélio mostrando parte dos conidióforos ligados a si, estando a outra parte na base dos conídios maduros que se libertaram (Dingley, 1962).	- 10 -
Figura 4: <i>Pithomyces chartarum</i> - germinação e esporulação (adaptado de Mulvaney, 2011 referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013).	- 10 -
Figura 5: Esporidesmina A (Woodcock <i>et al.</i> , 2001a).	- 13 -
Figura 6: Esporidesmina D (Woodcock <i>et al.</i> , 2001b).	- 13 -
Figura 7: Distribuição do n.º de esporos por grama de erva seca nas plantas de <i>Lolium perene</i> , ver Tabela 5 (adaptado de Brook, 1963)	- 19 -
Figura 8: Diferentes géneros de esporos passíveis de confusão com esporos de <i>P. chartarum</i> (Oldman & di Menna, 1983)	- 23 -
Figura 9: Ciclo de auto oxidação do ditíol, formado a partir de glutationa reduzida e da ponte dissulfeto da esporidesmina reduzida (Morris <i>et al.</i> , 2004)	- 28 -
Figura 10: Inspeção visual do fígado - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014	- 67 -
Figura 11: Inspeção por palpação do fígado - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014	- 67 -
Figura 12: Incisão do fígado para inspeção do parênquima - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014	- 68 -
Figura 13: Fragmentos de fígado para análise histopatológica - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014	- 68 -
Figura 14: Fígado classificado com grau I de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose	- 69 -
Figura 15: Fígado classificado com grau II de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose	- 69 -
Figura 16: Fígado classificado com grau II de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose, onde é visível a palidez e fibrose do bordo do lobo esquerdo	- 69 -
Figura 17: Fígado classificado com grau III de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose	- 70 -
Figura 18: Fígado classificado com grau IV de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose	- 70 -
Figura 19: Fígado classificado com grau IV de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose	- 70 -
Figura 20: 4x. Grau I. Cápsula de Glisson espessada e infiltrado inflamatório em redor dos vasos	- 98 -
Figura 21: 10x Grau I. Infiltrado inflamatório periportal, tumefação celular e degenerescência hidrópica dos hepatócitos	- 98 -

Figura 22: 10x. Grau I. Cápsula de Glisson espessada e infiltrado inflamatório em redor do vaso.....	-98-
Figura 23: 10x. Grau I. Veia centrolobular e sinusoides. Ligeira fibrose perilobular com alguma desorganização do parênquima lobular.....	-98-
Figura 24: 40x. Grau I. Tumefação e degenerescência hidrópica dos hepatócitos, desorganização do parênquima lobular e cariólise.....	-98-
Figura 25: 10x. Grau II. Veia centrolobular rodeada por células inflamatórias.....	-98-
Figura 26: 10x. Grau II. Espaço porta com intenso infiltrado inflamatório.....	-99-
Figura 27: 40x. Grau II. Veia centrolobular com espessamento da túnica média.....	-99-
Figura 28: 4x. Grau III Fibrose intensa e hiperplasia biliar.....	-99-
Figura 29: 10x. Grau III. Hiperplasia biliar com fibrose pericanalicular.....	-99-
Figura 30: 10x. Grau III. Foco de regeneração hepática rodeado por fibrose.....	-100-
Figura 31: 40x. Grau III. Espessamento da túnica íntima e média do vaso.....	-100-
Figura 32: 4x. Grau IV. Pseudolobulação com fibrose do espaço interlobular.....	-100-
Figura 33: 4x. Grau IV. Padrão lobular com fibrose do tecido conjuntivo interlobular.....	-100-
Figura 34: 10x. Grau IV. Degenerescência hidrópica centrolobular, sendo os hepatócitos periportais lesões mais leves.....	-100-

---

## Lista de Abreviaturas

---

ABC	<i>ATP-Binding cassette</i> – Cassete de ligação de ATP
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AST	Aspartato Aminotransferase
Cu	Cobre
DD	Diagnóstico Diferencial
EF	Eczema Facial
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio Imunoenzimático
ETP	Epipolítiodioxopiperazina
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nation</i> – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FAS	Fosfatase Alcalina Sérica
F/E	Fibrose/esclerose
FTS	Fotossensibilidade
GDH	Glutamato Desidrogenase
GGT	Gama-glutamilttransferase
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> - Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
HPQ	Hiperqueratose
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência Internacional de Pesquisa do Cancro
K - S	Kolmogorov-Smirnov
ln	Logaritmo Natural
Mb	Mega pares de bases
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigénio atómico
pv	Peso vivo
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> - Locus controladores de características quantitativas
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de Zinco
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Zinco
\$NZ	Dólares Neozelandeses

# 1.Introdução

---

## 1.1.Micotoxicoses

No século II antes de Cristo, datação provável dos Manuscritos do Mar Morto, algumas descrições parecem evidenciar a existência e ação de micotoxinas, ainda que a sua antiguidade se deva aproximar à das culturas agrícolas (Richard, 2007). As micotoxinas são metabolitos secundários de fungos filamentosos (Krogh, 1978; Zain, 2011), não exercendo nenhum papel fundamental no ciclo de vida dos organismos que as produzem (Zain, 2011). Estas são produzidas em condições de temperatura e humidade favoráveis, ficando armazenadas nos esporos, micélio ou sendo excretadas para o substrato, como exotoxinas (Krogh, 1969). A mesma micotoxina pode ser produzida por vários fungos e o mesmo fungo pode produzir diferentes micotoxinas, mas nem todos os metabolitos secundários dos fungos são micotoxinas (Zain, 2011). Os fungos produtores de micotoxinas desenvolvem-se em estreita relação com as plantas, quer elas estejam no campo ou armazenadas para consumo humano ou animal. Assim, as micotoxinas entram na cadeia alimentar de animais nos quais podem provocar intoxicações, as micotoxicoses (Mostrom & Jacobsen, 2011).

As micotoxinas não são infecciosas nem contagiosas mas são tóxicas em doses baixas. Ao serem absorvidas, inaladas ou ingeridas (mais comum) podem causar doenças nos humanos e animais, as micotoxicoses (Tabela 1) (Bennett, 1987; Richard, 2007; Zain, 2011). A gravidade, aquando de uma micotoxicose, dos sinais clínicos apresentados por um indivíduo (animal ou humano), depende: do tipo e quantidade de micotoxina; do tempo de exposição a esta; da idade; do sexo; estado de saúde e estado nutricional do indivíduo (Bennett & Klich, 2003; Gallo *et al.*, 2015). Os ruminantes parecem ser mais resistentes à ação de micotoxinas do que os monogástricos, pois a microbiota e as partículas alimentares do rúmen parecem ligar-se às toxinas, contribuindo para a sua desativação ou degradação (Zain, 2011; Gallo *et al.*, 2015). As micotoxinas podem ter ação carcinogénica como é o caso das aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, zearalenona, toxina T-2, ocratoxina e alguns *ergot* alcalóides (Richard, 2007). As micotoxicoses agudas são raras, sendo a manifestação crónica a mais importante e a subclínica a mais frequente (Gallo *et al.*, 2015). O diagnóstico é difícil pois os sinais clínicos são semelhantes aos de outras doenças. A colheita, preparação e análise de amostras para confirmação da presença de micotoxinas deve ser cuidadosa de modo a não inviabilizar a identificação das toxinas (Richard, 2007).

Quanto ao controlo das micotoxicoses nos animais há três linhas principais de ação: prevenção ou diminuição do consumo da toxina (evitar alimento contaminado – pastagem, grão, feno, silagem; redução da produção de micotoxina; alteração da população de fungos), proteção dos animais contra a micotoxina ingerida e melhoramento genético dos animais para conseguir que estes sejam mais resistentes (Towers, 2006).

Tabela 1: Algumas das micotoxinas e micotoxicoses mais relevantes em animais de produção.

Fungo	Micotoxina	Plantas	Seres vivos suscetíveis	Ação Principal	Outros	Bibliografia
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus niger</i>	Ocratoxina A	<i>Vitis vinifera</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Glycine max</i> <i>Coffea</i> spp.	Humanos Suínos Aves	Nefrotóxica Nefrocarcinogénica	Limites estipulados na alimentação humana e animal. Possível carcinogénico humano-grupo 2B	(Krogh, 1978) (Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) (Commission Regulation 1881/2006, 2006) (Richard, 2007) (Zain, 2011) (International Agency for Research on Cancer, 2015)
<i>Claviceps paspali</i>	Indol diterpenos – paspalinina, paspalitremos A - C	<i>Paspalum</i> spp. <i>Cynodon dactylon</i> <i>Lolium perenne</i>	Bovinos Equinos	Neurotóxica	-	(Riet-Correa <i>et al.</i> , 2013) (Smith & Towers, 2002)
<i>Neotyphodium lolii</i>	Indol diterpenos (paxilina, lolitremo B); Alcalóides peptídicos (ergovalina); inseticida (peramina)	<i>Lolium perenne</i>	Bovinos Ovinos, Equinos	Neurotóxica Miotóxica	-	(Riet-Correa <i>et al.</i> , 2013) (Smith & Towers, 2002)
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Tricotecenos do tipo B não macrocíclicos - Desoxivalenol ou vomitoxina ou DON	<i>Zea mays</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Avena sativa</i> <i>Hordeum vulgare</i>	Suínos Humanos Caninos Felinos	Imunossupressora Nefrotóxica	Limites estipulados na alimentação humana e animal. Não classificado quanto à carcinogenicidade humana-grupo 3	(Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) (Commission Regulation 1881/2006, 2006) (Richard, 2007) (Zain, 2011) (International Agency for Research on Cancer, 2015)
<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisinias B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> e B <sub>3</sub>	<i>Zea mays</i> <i>Sorghum bicolor</i> <i>Oryza sativa</i>	Equinos Suínos Humanos	Hepatotoxicidade (metabolismo de esfingolípidos)	Limites estipulados na alimentação humana e animal. Possível carcinogénico humano-grupo 2B	(Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) (Commission Regulation 1881/2006, 2006) (Richard, 2007) (Zain, 2011) (International Agency for Research on Cancer, 2015)
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Zearalenona – lactona do ácido fenólico resorcíclico	<i>Zea mays</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Sorghum bicolor</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Secale cereale</i>	Suínos Aves Bovinos	Efeito estrogénico	Limites estipulados na alimentação humana e animal. Não classificado quanto à carcinogenicidade humana-grupo 3	(Smith & Towers, 2002) (Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) (Commission Regulation 1881/2006, 2006) (Richard, 2007) (Zain, 2011) (International Agency for Research on Cancer, 2015)

<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Tricotecenos tipo A não macrocíclicos - Toxina T - 2	<i>Zea mays</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Avena sativa</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Secale cereale</i>	Aves	Inibição da síntese de proteínas	Limites estipulados na alimentação humana e animal. Não classificado quanto à carcinogenicidade humana-grupo 3	(Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) (Richard, 2007) (Zain, 2011) (Commission Recommendations 2013/165/EU, 2013) (International Agency for Research on Cancer, 2015)
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	<i>Zea mays</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Gossypium</i> spp. <i>Oryza sativa</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Capsicum</i> spp.	Bovinos Humanos	Hepatotoxicidade Genotoxicidade Mutagénica Imunodepressora Teratogénica Carcinogénica	Limites estipulados na alimentação humana e animal. Carcinogéneo humano-grupo 1	(Bennett & Klich, 2003) (Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) (Richard, 2007) (Zain, 2011) (Commission Recommendations 2013/165/EU, 2013) (International Agency for Research on Cancer, 2015) (Varga <i>et al.</i> , 2015)
<i>Claviceps</i> spp.  <i>Neotyphodium coenophialum</i>	<i>Ergot</i> alcalóides	<i>Holcus lanatus</i> <i>Poa pratensis</i> <i>L. multiflorum</i> L. <i>Festuca arundinacea</i>	Ovinos Bovinos Suínos Equinos Aves Humanos	Neurotoxicidade Alterações da circulação sanguínea	Limites estipulados na alimentação humana e animal.	(FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004) (Richard, 2007) (EFSA - CONTAM, 2012) (Craig <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pithomyces chartarum</i>	Esporidesmina	<i>Lolium perenne</i>	Ovinos Bovinos Caprinos Alpacas Gamas Veados	Toxicidade biliar e hepática Nefrotoxicidade	-	(Synge & White, 1959) (Synge & White, 1960) (Phua <i>et al.</i> , 2008) (Dairy Australia FE Working Group, 2013)

### 1.1.1. Aflatoxicose

As aflatoxinas são produzidas por 17 espécies pertencentes às secções ou complexos de espécies *Flavi*, *Ochraceorosei* e *Nidulantes* do género *Aspergillus* (Varga *et al.*, 2015), contudo são as estirpes tóxicas das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que maior expressão têm na produção das aflatoxinas B<sub>1</sub> (Figura 1), B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, as quais se relacionam estruturalmente com as difuranocumarinas (Bennett & Klich, 2003; Richard, 2007; Zain, 2011; Varga *et al.*, 2015). A classificação das aflatoxinas tem por base a sua fluorescência quando incididas por radiação ultravioleta (UV) e pela sua mobilidade relativa no método de cromatografia em camada fina. A aflatoxina B<sub>1</sub> é o carcinogéneo natural mais potente que se conhece, sendo a principal micotoxina produzida pelas estirpes tóxicas (Bennett & Klich, 2003; Varga *et al.*, 2015). A aflatoxina M<sub>1</sub> é um metabolito hidroxilado resultante da aflatoxina B<sub>1</sub>, encontrado-se nos tecidos e fluídos (leite e urina) de animais intoxicados (Richard, 2007; Zain, 2011).

O *Aspergillus flavus* tem um genoma de 36,7 mega pares de bases (Mb) e, aproximadamente, 12197 genes distribuídos por oito cromossomas. A produção de aflatoxinas é codificada por 30 genes localizados na zona peritelomérica do cromossoma três (Woloshuk & Shim, 2013).

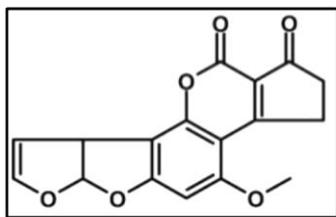


Figura 1: Estrutura da aflatoxina B<sub>1</sub> representativa das restantes aflatoxinas (Richard, 2007).

O fungo, através dos seus conídios transportados pelo vento ou por insetos (besouros da seiva da *Família Nitidulidae*, lagarta de *Helicoverpa zea* e traça *Ostrinia nubilalis*), chega às culturas (*Zea mays* - milho, *Arachis hypogaea* - amendoim, *Gossypium* spp. - algodão, *Oryza sativa* - arroz, *Triticum aestivum* - trigo, *Capsicum* spp. - pimentão, entre outras) e estabelece-se no tecido vegetal vivo, aproveitando para tal qualquer alteração na integridade das plantas. Se as condições

climáticas proporcionarem um ambiente húmido a formação de aflatoxinas é mais provável (Richard, 2007; Varga *et al.*, 2015). Um grão de milho pode conter até 400 mg/Kg de aflatoxinas (Richard, 2007). O armazenamento de sementes a temperatura superior a 20°C e humidade relativa acima de 14% é favorável ao desenvolvimento do fungo (Richard, 2007).

No ser humano a aflatoxina B<sub>1</sub> tem ação hepatotóxica, genotóxica e carcinogénica, sendo um fator de risco no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Bennett & Klich, 2003; Richard, 2007; Zain, 2011; Varga *et al.*, 2015). As aflatoxinas são consideradas, desde 2012, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) como carcinogéneo humano (grupo 1), estando a aflatoxina M<sub>1</sub> classificada como possível carcinogéneo (grupo 2B) (International Agency for Research on Cancer, 2015).

O local de toxicidade primária nos animais é o fígado, onde a aflatoxina B<sub>1</sub> desempenha primordial ação deletéria. Contudo, a ação das aflatoxinas é mais vasta, sendo, também, mutagénica, imunodepressora, teratogénica, carcinogénica, influenciando a produção de ovos, leite e o ganho de peso, produtos nos quais estas micotoxinas podem ser isoladas (Bennett, 1980; Richard, 2007). Cada animal apresenta suscetibilidade diferente a este grupo de micotoxinas, variando com a espécie, raça, idade, dose, período de exposição e condição nutricional (Bennett, 1980; Bennett & Klich, 2003; Richard, 2007). A aflatoxicose aguda é rara, podendo manifestar-se pelo aparecimento de diarreia, anorexia, depressão, icterícia, fotodermatite, edema submandibular, sinais de alteração nervosa e aborto. A forma mais frequente de aflatoxicose é crónica, havendo diminuição do ganho de peso, redução na produção de leite, perda de condição corporal (função hepática diminuída), pelagem em mau estado, cólicas abdominais, depressão, anorexia, bruxismo, fotossensibilidade e tenesmo rectal, o qual pode causar prolapso rectal. A aflatoxicose subclínica é a forma mais importante, pois os animais apresentam sinais clínicos muito comuns, tais como mastites, diarreia, imunodepressão, doença respiratória, diminuição da produção de leite e do ganho de peso (Krogh, 1969; Bbosa *et al.*, 2013; Riet-Correa *et al.*, 2013).

A avaliação da função hepática através da mensuração das enzimas fosfatase alcalina sérica (FAS) e gamaglutamiltransferase (GGT) permite aferir a existência de lesões hepáticas nos bovinos, neste caso provocadas pelas aflatoxinas (Riet-Correa *et al.*, 2013). O diagnóstico é presuntivo, pois não há lesões histopatológicas específicas e a análise negativa dos alimentos consumidos no presente para pesquisa de aflatoxinas, não garante que o alimento consumido no passado não estivesse contaminado. Assim, devem ter-se em conta os sinais clínicos dos animais, os dados anatomohistopatológicos e epidemiológicos para diagnosticar um caso de aflatoxicose (Riet-Correa *et al.*, 2013).

As alterações patológicas macroscópicas em casos agudos são a presença eventual de hemorragias e icterícia nos músculos esqueléticos, nos linfonodos, no tecido subcutâneo, no trato gastrointestinal e no pericárdio. Nos animais com lesões crónicas há edema do mesentério, da parede do abomaso e da parede da vesícula biliar, a qual se apresenta dilatada. O fígado apresenta alterações na coloração e consistência. A nível microscópico hepatócitos isolados apresentam necrose ou vacuolização, há fibrose periportal, megalocitose e proliferação celular dos ductos biliares (Riet-Correa *et al.*, 2013).

Não há tratamento para a aflatoxicose. Deve retirar-se, de imediato, a fonte de alimento contaminado e ser providenciado aos animais, alimento nutricionalmente ideal (Mostrom & Jacobsen, 2011).

Na Comunidade Europeia estão vigentes os limites de aflatoxinas na alimentação para animais (ruminantes - Tabela 2) e humanos (alimentos de origem animal - Tabela 3) sugeridos pela

Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agricultural Organization of the United Nation – FAO*) (FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004) e patente na Diretiva 2002/32/EC, 2002 e na Commission Regulation 1881/2006, 2006.

Tabela 2: Limites máximos da presença de aflatoxina B<sub>1</sub> na alimentação de ruminantes na Comunidade Europeia (Diretiva 2002/32/EC, 2002; FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004)

Alimentação de ruminantes	Limite aflatoxina B <sub>1</sub> (µg/Kg)
Qualquer matéria-prima	20
Alimento completo ou complementar para bovinos, ovinos e caprinos (exceções em *)	20
*Alimento completo ou composto para animais de apetência leiteira	5
*Alimento completo ou composto para bezerros e borregos	10

Tabela 3: Limite máximo da presença de aflatoxinas M<sub>1</sub> no leite e derivados para alimentação humana na Comunidade Europeia (FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004; Commission Regulation 1881/2006, 2006)

Leite e derivados	Limite aflatoxinas M <sub>1</sub> (µg/Kg)
Leite cru, leite para transformação em derivados e leite tratado termicamente	0,05

### 1.1.2. Ergotismo

O Ergotismo é provocado por *ergot* alcalóides (Figura 2) os quais se encontram nos ovários das culturas ou sementes sob a forma de *sclerotia* (agregação densa de tecido fúngico) ou são produzidos aquando da infeção de uma planta por fungos endofíticos (Richard, 2007; Riet-Correa *et al.*, 2013). A quantidade de *ergot* alcalóides produzida depende da estirpe do fungo e da localização geográfica em que se encontra, variando entre 0,01% e 0,05% a quantidade total na *sclerotia* (Craig *et al.*, 2015).

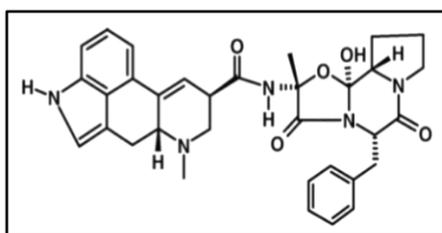


Figura 2: Estrutura da ergotamina H, representativa dos restantes *ergot* alcalóides (Richard, 2007).

Os *ergot* alcalóides dividem-se em dois grupos principais: alcalóides tipo ergolina (ácido lisérgico, lisergol, amida ácida e ergonovina) e alcalóides peptídicos (ergotamina, ergocristina, ergosina, ergocriptina, ergocornina e ergovalina) (Riet-Correa *et al.*, 2013). Os fungos do género *Claviceps* spp. são os mais associados aos *ergot* alcalóides (ergotamina, ergocristina, ergosina, ergocornina e ergocriptina), especialmente a espécie *Claviceps purpurea*, embora *C. fusiformis* e *C. paspali* também estejam implicados. As plantas em que o fungo *Claviceps* spp. se desenvolve são, por exemplo de *Holcus*

*lanatus* - erva lanar, *Poa pratensis* - erva de febra - e *Lolium multiflorum* L. - azevém. Também os fungos endofíticos, como é o caso de *Neotyphodium coenophialum* produzem ergot péptidos, como a ergovalina, em plantas hospedeiras, neste caso *Festuca arundinacea* - erva carneira (Richard, 2007).

A toxicidade da pastagem pode variar com a sua constituição botânica, com a percentagem de plantas infetadas, com a percentagem de *Festuca arundinacea* - erva carneira - presente e com a utilização de fertilizantes azotados. A pressão e tipo de pastoreio influenciam a probabilidade dos animais sofrerem intoxicação (Riet-Correa *et al.*, 2013).

Os ergot alcalóides afetam humanos, ovinos, bovinos, suínos, equinos e aves. Estão descritos dois tipos de ergotismo: o ergotismo gangrenoso (vasoconstrição) e o ergotismo convulsivo (sinais neurológicos e abortos) (Craig *et al.*, 2015). Os sinais clínicos apresentados são, essencialmente, de natureza gangrenosa, hipertérmica e reprodutiva (agalaxia ou hipoagalaxia). As alterações do sistema nervoso, que em seres humanos estão relacionadas com *Claviceps purpurea*, nos animais parecem ter origem nos alcalóides indol triterpenos de *Claviceps paspali* (Riet-Correa *et al.*, 2013). A interação de ergot alcalóides com recetores dopaminérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos provoca vasoconstrição das arteríolas, originando hipertermia e gangrena. Em climas frios os animais tendem a apresentar ergotismo gangrenoso e em climas quentes hipertermia, ainda que isto não se verifique de forma tão linear. A forma reprodutiva desenvolve-se em equinos pela interferência na secreção de prolactina e pelo desenvolvimento diminuto da glândula mamária no início da lactação ou pela baixa produção de leite durante a lactação. Nos bovinos intoxicados com *Festuca arundinacea* - erva carneira - infetada com o referido fungo pode desenvolver-se necrose da gordura abdominal (Smith & Towers, 2002; Riet-Correa *et al.*, 2013).

Na observação histológica dos tecidos de animais afetados por ergotismo gangrenoso pode detetar-se necrose de coagulação na pele e tecido subcutâneo, encontrando-se nas camadas mais profundas da derme proliferação de tecido de granulação. Nas arteríolas a camada muscular apresenta-se hiperplásica estando o lúmen diminuído (Riet-Correa *et al.*, 2013).

A existência de sinais clínicos e alterações patológicas compatíveis com a intoxicação, assim como a presença de *sclerotia* de *Claviceps purpurea* no alimento ou da contaminação de *Festuca arundinacea* - erva carneira - por *Neotyphodium coenophialum* (observação de fragmentos de folhas corados com azul de anilina), permite a identificação etiológica da doença. Quando os alimentos são derivados de grãos moídos com *sclerotia* de *C. purpurea* e esta não pode ser identificada, é necessário investigar a presença de ergot alcalóides, o que pode ser conseguido através de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Riet-Correa *et al.*, 2013) ou cromatografia líquida de alto rendimento (Craig *et al.*, 2015; Riet-Correa *et al.*, 2013).

O tratamento desta doença é sintomático, devendo ser imediatamente retirado aos animais o alimento contaminado, seja ele grão ou pastagem. A avaliação das pastagens e das sementes deve ser realizada para impedir o consumo de alimento em risco (Riet-Correa *et al.*, 2013).

A profilaxia passa por manejo das pastagens, suplementação com alimento saudável e possível introdução, na pastagem, de *Festuca arundinacea* - erva carneira - infetada com estirpes de endófitos produtores de quantidades mínimas de micotoxinas (Smith & Towers, 2002).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA) recomenda que os limites máximos de ingestão de *ergot* alcalóides num humano adulto não ultrapassem 0,6 µg/Kg de peso vivo (pv) por dia (EFSA - CONTAM, 2012). Nos animais os limites de *ergot* alcalóides são recomendados pela FAO, sendo de 1000000 µg de *ergot* na totalidade do produto da qual provém a amostra (FAO Food and Nutrition Paper No. 81, 2004).

### 1.1.3. Pitomicotoxicose – Eczema facial (EF)

A primeira descrição datada, da patologia que hoje se conhece como pitomicotoxicose, ocorreu em ovinos, na Nova Zelândia em 1887. Contudo, foram precisos mais de 60 anos, 1938, para que se iniciasse o primeiro programa de investigação sobre esta doença, pois foi nesse ano que ocorreu um surto que mediatizou a doença nesse país (Scott, 1989 referido por Phua *et al.*, 2008; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Em 1958, comprovou-se a ação do fungo *Pithomyces chartarum* na patogénese da doença (Percival, 1959a; Thornton & Percival, 1959), tendo dois anos mais tarde sido identificada e nomeada esporidesmina, a micotoxina produzida pelos esporos do fungo, à qual foi atribuída a etiologia da pitomicotoxicose (Synge & White, 1959; Synge & White, 1960), tornando-se uma das primeiras micotoxicoses a ser estudada (Smith & Towers, 2002).

Inicialmente, o que hoje se designa por *Pithomyces chartarum*, foi intitulado *Sporidesmium bakeri*, Syd (Thornton & Percival, 1959; Worker, 1960), apresentando diversos sinónimos como: *Sporidesmium chartarum* Berk. & Curt., *Piricauda chartarum* (Berk & Curt) R. T. Moore, *Sporidesmium echinulatum* Spegazzini, *Scheleobracea echinulata* (Speg.) Hughes (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003).

A pitomicotoxicose pode apresentar outras designações como esporidesmiotoxicose, a qual tem em conta a etiologia da doença na micotoxina esporidesmina, contudo é uma denominação pouco utilizada (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A designação mais conhecida, talvez por ter sido a primeira, é a de eczema facial, baseando-se nas lesões dermatológicas que os ovinos desenvolvem na face, no entanto, estas variam a sua localização nas diferentes espécies afetadas, além de que há muitos animais, independentemente da espécie, que apresentam lesões orgânicas internas sem manifestação de alterações na pele. Assim, este é um termo aceite para designar a doença ainda que não seja o mais correto, pois restringe a patologia à

sua manifestação dermatológica deixando de parte a menção a lesões orgânicas, entre elas as hepatobiliares que são fundamentais no curso e gravidade da doença (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A micotoxina esporidesmina, proveniente dos esporos de *P. chartarum*, provoca lesões hepatobiliares, tendo como consequência o eventual aparecimento de fotossensibilidade (FTS)<sup>1</sup> secundária<sup>2</sup> (Thornton & Percival, 1959; Mortimer & Taylor, 1962 referido por Munday *et al.*, 2001; Glenn *et al.*, 1964; Mortimer & Stanbridge, 1969; Smith & O'Hara, 1978; Towers *et al.*, 1990; Smith & Payne, 1991; Phua *et al.*, 1999; Phua *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010). Os animais intoxicados por esporidesmina têm o seu bem-estar, saúde e produtividade diminuídos (Mortimer & Taylor 1962 referido por Munday *et al.*, 2001; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os animais que sofrem lesões hepatobiliares mas não desenvolvem fotossensibilidade são os que maior impacto económico causam nas explorações (Southey *et al.*, 1986 referido por Morris *et al.*, 1988; Towers *et al.*, 1990; Dairy Australia FE Working Group, 2013). As perdas económicas devem-se a mortes, perda ou redução no ganho de peso, diminuição da produção leiteira em bovinos, do desempenho reprodutivo e longevidade em ovinos (Smith & O'Hara, 1978; Smeaton *et al.*, 1985; Towers *et al.*, 1990; Dairy Australia FE Working Group, 2013). É muito relevante o elevado número de animais que é necessário enviar para abate após um surto de pitomicototoxicose (Smith & O'Hara, 1978; Towers *et al.*, 1990). À perda de animais, anteriormente produtivos, enviados para abate, pode ainda somar-se a desvalorização ou rejeição da carcaça (por exemplo por icterícia ou anorexia) e a rejeição hepática entre 5,5% e 90% em rebanhos acometidos, segundo Edwards *et al.*, 1981.

Um artigo publicado em 1984, relativo a um período de estudo de seis anos, referiu que o prejuízo relativo à pitomicototoxicose na agropecuária neozelandesa era cerca de 30 milhões de dólares neozelandeses (\$NZ) anuais (Smith & Towers, 1984 referido por Fitzgerald *et al.*, 1998). Já Faull, 1991, estimou que a indústria leiteira na Nova Zelândia despense entre dez a cem milhões de

---

<sup>1</sup> A fotossensibilidade define-se como sendo uma sensibilidade exagerada da pele à radiação ultravioleta quando um agente fotodinâmico está presente na circulação periférica (Glenn *et al.*, 1964). Divide-se em três grupos: fotossensibilidade primária, fotossensibilidade associada a deficiente metabolismo de pigmentos e fotossensibilidade secundária ou hepatógena (Cunningham *et al.*, 1942 e Clare, 1952 referidos por Glenn *et al.*, 1964).

<sup>2</sup> A fotossensibilidade secundária ou hepatógena é a forma mais importante de fotossensibilidade em ruminantes, devendo-se a lesões hepáticas que impossibilitam a excreção biliar correta de fitoporfirina, a qual resulta da ação fermentativa da microbiota indígena presente no rúmen sobre a clorofila das plantas. Fisiologicamente, a ligação tetrapirrol dupla ou simples da fitoporfirina é totalmente conjugada numa porfirina aromática ou, devido à sua similaridade estrutural com a bilirrubina, pode ser conjugada com ácido glucurónico nos hepatócitos de modo a facilitar a excreção biliar, apesar da última hipótese ainda não ter sido confirmada. As lesões hepáticas iniciais podem ser causadas por toxinas hepáticas de origem química ou provenientes de plantas e fungos, ou por agentes infecciosos, como a *Leptospira interrogans*, ou por outros com capacidade de provocar abscessos hepáticos. Qualquer causa que possa desencadear obstrução do circuito biliar (litíase biliar por exemplo) contribui para a permanência de fitoporfirina em circulação (Glenn *et al.*, 1964; Glenn *et al.*, 1965; Smith & O'Hara, 1978; Campbell *et al.*, 2010; Quintas *et al.*, 2014). A fitoporfirina em circulação é absorvida pelas células, acumulando-se, principalmente, na mitocôndria e aparelho de Golgi, sendo que a acumulação de agentes fotodinâmicos nas mitocôndrias parece relacionar-se com uma maior gravidade da fotossensibilidade apresentada pelos animais (Scheie *et al.*, 2002). A fotossensibilidade hepatógena foi dividida em dois grupos principais, tendo em conta a localização da lesão primária: grupo com lesões primárias do parênquima hepático e grupo com lesões primárias dos ductos biliares (Kellerman & Coetzer, 1984 referido por Flaoyen *et al.*, 1991).

\$NZ, dependendo da severidade da doença em cada ano. Mais recentemente, Phua *et al.*, 2008, determinou que, anualmente, a afeção de ovinos com pitomicotoxicose na Nova Zelândia, representa um custo de 63 milhões de \$NZ.

### 1.1.3.1.Etiologia

A espécie *Pithomyces chartarum* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae, Género *Pithomyces*. É um fungo mistospórico<sup>3</sup>, cosmopolita e saprófita das plantas (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003; Brook, 1969; Clive *et al.*, 1981; Association, 2015; Naturalis, 2015). Tem como forma teleomórfica a *Leptosphaerulina chartarum*, identificada primeiramente na África do Sul em sete isolados (Roux, 1986), havendo também o seu registo no Brasil (Russomanno *et al.*, 2003).

#### 1.1.3.1.1.Morfologia e ciclo de vida do fungo *Pithomyces chartarum*

Durante a germinação dos esporos ou conídios formam-se hifas superficiais hialinas, as quais penetram inter e intracelularmente nos tecidos vegetais, formando-se haustoria em intervalos irregulares. As hifas que compõem o micélio, o qual apresenta pigmentação ligeira, são ramificadas, septadas, exibindo, por vezes, espaçadamente, clamidósporos unicelulares, com quatro a oito µm de diâmetro. As hifas, que medem entre 2,5 a 4,5 µm de diâmetro, formam ligações entre si, construindo uma rede densa. Conidióforos emergem do micélio superficial a partir de espessamentos lanciformes (Dingley, 1962), estes são curtos (3 a 10 nm de comprimento), simples, hialinos, com parede fina, geralmente não segmentados, que se elevam, em ângulo reto, além do micélio, dando origem cada um a um conídio terminal. Quando o conídio atinge a maturidade, o conidióforo apresenta um anel, contíguo ao conídio, onde a parede se apresenta mais fina. O anel do conidióforo aumenta, provocando a rutura entre este e o esporo, o qual é libertado. Um remanescente do conidióforo permanece ligado à base do esporo, através de um denticulo, mesmo após este ser libertado (Figura 3). A outra parte do conidióforo

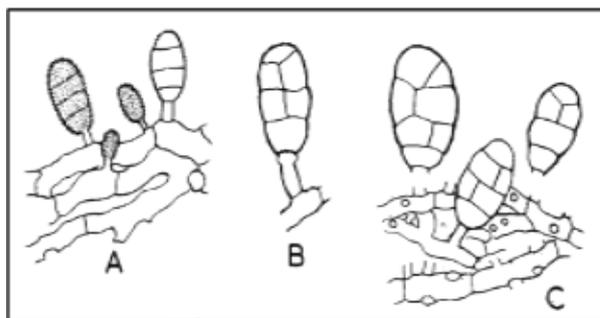


Figura 3: *Pithomyces chartarum*. A) Conídios e micélio. B) Conidióforo com anel dilatado e de parede fina na base do conídio. C) Micélio mostrando parte dos conidióforos ligados a si, estando a outra parte na base dos conídios maduros que se libertaram (Dingley, 1962).



Figura 4: *Pithomyces chartarum* - germinação e esporulação (adaptado Mulvaney, 2011 referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013).

<sup>3</sup> Forma reprodutiva assexuada de um fungo

permanece junto ao micélio basal. Devido ao processo de libertação dos esporos, alguns autores consideram que estes são na verdade clamidósporos terminais (Ellis, 1960 referido por Collin & Towers, 1995a; Dingley, 1962; Butler & Crisan, 1977 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

Os esporos maduros do fungo apresentam 10 a 17  $\mu\text{m}$  (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003) ou 13 a 20  $\mu\text{m}$  de largura (Dingley, 1962) por 18 a 29  $\mu\text{m}$  (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003) ou 16 a 35  $\mu\text{m}$  de comprimento (Dingley, 1962), cor escura (castanho escuro ou negro), aspeto rugoso ou verrugoso e muriforme ou equinulado (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003; Brook, 1969; Clive *et al.*, 1981). Cada esporo é composto por um (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003) ou dois a quatro septos longitudinais (Dingley, 1962) e três (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003) a quatro septos transversais (Figuras 3 e 4) (Dingley, 1962). A esporulação pode demorar dois dias ou prolongar-se por mais de um mês, dependendo da estirpe de *P. chartarum*, sendo a demora na produção de micotoxina equivalente (di Menna *et al.*, 1970).

#### 1.1.3.1.2.Esporidesmina

O papel que a micotoxina esporidesmina desempenha no ciclo de vida do fungo *P. chartarum* ainda não foi identificado, contudo para a sobrevivência do fungo este metabolito não é essencial, visto existirem estirpes que não são tóxicas, isto é, não são produtoras de esporidesmina (Collin *et al.*, 1998a).

Todos os isolados de *P. chartarum* são potencialmente produtores de quantidades moderadas a elevadas de esporidesmina, dependendo dessa produção das condições físicas e químicas do ambiente e do grau de esporulação do fungo (Done *et al.*, 1961 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Dingley, 1962; di Menna *et al.*, 1970 e di Menna *et al.*, 1977 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988), contrariamente ao pensado inicialmente, em que o número de esporos era relacionado de forma inequívoca com a toxicidade da pastagem (Thorton & Sinclair, 1960). Ainda que todos os isolados sejam produtores potenciais de esporidesmina, é aceite a existência de estirpes tóxicas (produtoras de esporidesmina) e de estirpes que não são tóxicas (não produtoras de esporidesmina mesmo com taxas de esporulação elevadas) (Ellis, 1960 referido por Russomanno *et al.*, 2003; Brook, 1969; Clive *et al.*, 1981). Assim, em estirpes produtoras de esporidesmina, quanto mais elevada a taxa de esporulação maior a quantidade de micotoxina produzida (di Menna *et al.*, 1970). As estirpes que não são tóxicas podem apresentar, por vezes, taxas de esporulação superiores às estirpes tóxicas (Ueno *et al.*, 1974). Parecem existir diferenças a nível molecular entre as estirpes produtoras e não produtoras de esporidesmina, contudo é necessária mais investigação que o confirme (di Menna *et al.*, 2009).

As estirpes tóxicas produzem a esporidesmina no micélio, concentrando-a nos esporos aquando da esporulação (di Menna *et al.*, 1970; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A toxicidade das estirpes de *P. chartarum*, ou seja, a capacidade para produzir a micotoxina esporidesmina, varia de região para região, podendo, por exemplo, no mesmo país coexistirem estirpes tóxicas e outras que não são tóxicas (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A esporidesmina pertence à classe epipolítiodioxopiperazina (ETP) (Waring *et al.*, 1990; Woodcock *et al.*, 2001a; Collett, 2014), de metabolitos secundários de fungos, onde se inclui, também, a gliotoxina (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). As nove esporidesminas conhecidas (A, B, C, D, E, F, G, H e J) são heterociclos de azoto policíclico, as quais resultam da condensação de L- triptofano com L-alanina, estando estes em proporções variáveis na composição de cada esporidesmina (Taylor, 1971 e Athernthon *et al.*, 1974 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). São constituídas por duas partes: uma clorada e aromática derivada do triptofano e outra derivada da piperazina, onde consta, normalmente, uma ponte dissulfeto<sup>4</sup>. A existência destas estruturas foi confirmada por ressonância magnética nuclear e por difração de raio X (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Modificações simples no enxofre remanescente das esporidesminas permitem a conversão de uma esporidesmina em outra (Athernthon *et al.*, 1974, referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

Em 1971, estudou-se a relação entre a estrutura e a atividade biológica das diferentes esporidesminas em modelos simples *in vitro*, estudou-se a sua ação bactericida contra *Bacillus subtilis* e a sua atividade citotóxica em várias linhagens de células cancerígenas (Taylor, 1971 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A Tabela 4 apresenta as relações entre a estrutura e a atividade de cada esporidesmina, com evidência para o papel primário do heterociclo contendo enxofre (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). As esporidesminas que possuem ponte polissulfeto (Tabela 4), apresentam um equilíbrio entre a forma reduzida e a forma oxidada, o que lhes permite catalisar a oxidação de azida sódica pelo iodo (esta reação permite a quantificação e caracterização do poder catalítico das esporidesminas) (Russel, 1960; Clare & Gumbley, 1962; Marbrook, 1964) e de reduzir o nitrato de prata, o hidróxido de alumínio e os sais de chumbo em meio básico (White *et al.*, 1977 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

**Tabela 4: Atividade química e biológica das esporidesminas (adaptado de Bonnefoi & Sauvagnac, 1988)**

Esporidesmina	Ponte polissulfureto <sup>5</sup>	Taxa de Produção	Toxicidade <i>in vitro</i>	Poder catalítico <sup>6</sup>
A	n = 2	85 – 95%	0,4 – 1 ng/ml	++
B	n = 2	3 – 6 %	2 – 3 ng/ml	++
C	n = 3	0,2%	500 ng/ml	++
D	n = 0	4 – 6%	≥ 1000 ng/ml	-
E	n = 3	2 – 3%	0,04 – 0,1 ng/ml	+
F	n = 0	0,5%	≥ 1000 ng/ml	-
G	n = 4	0,25%	2 ng/ml	++
H	n = 2	Não determinado	10 ng/ml	++

<sup>4</sup> Ligação enxofre – enxofre (S-S)

<sup>5</sup> n é o número de átomos de enxofre presente na ponte polissulfeto

<sup>6</sup> Poder catalítico na redução do iodo por azida sódica

A massa molar das várias esporidesminas varia entre 450 g/mol e 500 g/mol, o seu ponto de fusão varia de acordo com a presença e tipo de solvente de cristalização e são moléculas solúveis em solventes apolares (benzeno, tetracloreto de carbono, clorofórmio, éter e acetato de etilo), logo muito pouco solúveis em água (Clare & Gumbley, 1962; White *et al.*, 1977 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A espectroscopia de infravermelhos (IV) é usada na diferenciação das diferentes esporidesminas (White *et al.*, 1977 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

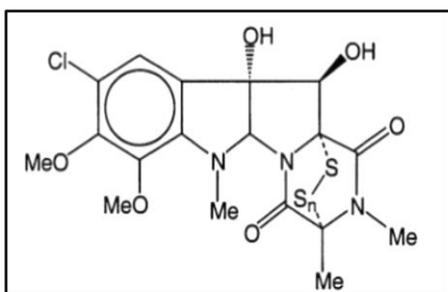


Figura 5: Sporidesmina A (Woodcock *et al.*, 2001a).

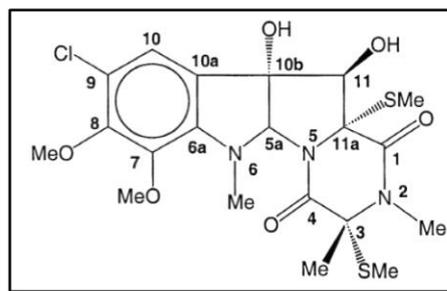


Figura 6: Sporidesmina D (Woodcock, *et al.*, 2001b).

As esporidesminas A e D (Figuras 5 e 6 respetivamente) representam as duas frações maioritárias da micotoxina nas estirpes tóxicas do fungo. A esporidesmina A representa mesmo cerca de 80% das esporidesminas produzidas. A esporidesmina D é sintetizada a partir da metilação redutiva da esporidesmina A (Taylor, 1971 e Athernthon *et al.*, 1974 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Munday, 1984a; Woodcock *et al.*, 2001b; Morris *et al.*, 2004). A toxicidade da esporidesmina A parece ter origem na sua ponte dissulfeto, já na esporidesmina D, a qual não é tóxica, o grupo dissulfeto está separado apresentando-se este metilado (Munday, 1982; Munday, 1984a.; Munday, 1984b; Munday, 1985; Morris *et al.*, 2004). A esporidesmina A em cultura pura é detetada por espectrofotometria ultravioleta (UV) a 254 nm (Marbrook, 1964), contudo a absorção pode ser registada entre 245 e 260 nm (Halder *et al.*, 1979).

Em 1960, na Austrália, determinou-se que um quilograma de esporos de *P. chartarum* tem cerca 260 mg de esporidesmina (Syngé & White, 1960), no mesmo ano outro estudo através de um teste Azida-Iodo (Russel, 1960), concluiu que em média 100000 esporos do fungo contêm 98 ng de esporidesmina, ou seja, 0,8 mg de esporidesmina por cada grama de esporos (Clare & Gumbley, 1962). Em 1974, foi indicado o valor de 1000 mg de esporidesmina por quilograma de esporos (Athernthon *et al.*, 1974 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Na década de 90, através de ELISA o valor foi revisto para 78 ng de esporidesmina por cada 100000 esporos, com uma correlação de 0,66 entre a contagem de esporos e os níveis de esporidesmina (Collin *et al.*, 1995). A quantidade de esporidesmina depende da estirpe do fungo e do nível de esporulação, sendo que os limites das variações parecem ser entre 0,6 e 3,5 ng de esporidesmina por cada  $10^6$  esporos (Collin *et al.*, 1998a).

Os esporos de *P. chartarum*, além da micotoxina esporidesmina, não possuem outras substâncias nocivas, pois a administração de esporos de estirpes que não são tóxicas a ovinos não provocou qualquer alteração no seu estado de saúde (Collin *et al.*, 1996). A identificação de três metabolitos de *P. chartarum* (pithomycono A, B e C), pertencentes à família de depsipeptídeos cíclicos, foi feita em isolados não tóxicos do fungo da Nova Zelândia, não estando presentes em isolados tóxicos (Collin & Towers, 1995).

Para explicar o mecanismo de toxicidade das ETP foram apontadas diversas origens, ainda que um esclarecimento final esteja pendente: alteração do fluxo de cálcio, interferência na ação de NF- $\kappa$ B, inibição das enzimas farnesil e geranylgeranyl transferase, formação de dissulfetos mistos entre parte da ETP e resíduos de cisteína de proteínas (por exemplo: creatina quinase) e entrada de ETP no ciclo de oxidação-redução com posterior formação de radicais livres de oxigênio. Qualquer forma de ação tóxica enumerada acima evidencia o papel fundamental das reações que envolvem tiol dissulfeto na toxicidade das ETP (Srinivasan *et al.*, 2006). Algumas ETP têm ação imunomoduladora, antibacteriana, antivírica e antineoplásica (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Waring *et al.*, 1990; Srinivasan *et al.*, 2006).

Inicialmente, pensou-se que ação da esporidesmina podia estar relacionada com a sua capacidade bactericida (Munday, 1982; Munday, 1984a; Munday, 1984b; Munday, 1985), a qual se perde provocando alterações estruturais na molécula sem que se danifique o enxofre heterocíclico (Mortimer & Collins, 1968 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Waring *et al.*, em 1990, mostraram que a esporidesmina, à semelhança de outros compostos do grupo, como a gliotoxina e ETP simples, causa danos citotóxicos nos macrófagos e blastos T através da indução de apoptose pela ação de uma endonuclease que provoca clivagem internucleossomal. Resulta deste processo de fragmentação, o aparecimento de corpos apoptóticos e condensação da cromatina (Waring *et al.*, 1990). Em condições *in vitro* a esporidesmina apresenta efeito clastogénico, em doses muito baixas. Contudo, *in vivo* esse efeito não foi observado devido, possivelmente, à desativação dos radicais livres ou à sua remoção dos tecidos (Ferguson *et al.*, 1992). A esporidesmina altera o metabolismo celular pela ação oxidativa que opera nos resíduos de cisteína de proteínas (Srinivasan *et al.*, 2006).

### 1.1.3.2. Condições para o desenvolvimento do ciclo de vida de *P. chartarum*

O ciclo de vida do fungo *P. chartarum* depende de três fatores: substrato, temperatura e humidade. A germinação do fungo é mais exigente em termos de humidade do que de temperatura (Thorton & Sinclair, 1960; Brook, 1963), sendo que sob determinadas condições climáticas pode realizar-se em qualquer altura do ano, enquanto a esporulação é mais exigente, ocorrendo essencialmente a partir do meio do Verão e prolongando-se pelo Outono (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

#### 1.1.3.2.1.Substrato

*P. chartarum* é um fungo saprófita, pode encontrar-se no solo e no ar (Dairy Australia FE Working Group, 2013) mas é na matéria vegetal morta que este encontra condições ideais para o seu ciclo de vida (Dingley, 1962; Brook, 1963; Dairy Australia FE Working Group, 2013), não se desenvolvendo em matéria vegetal viva, mesmo que esta apresente uma superfície de corte, nem a coloniza quando esta é contígua a matéria vegetal morta onde o fungo está bem estabelecido (Brook, 1963), ainda que estudos levados a cabo por Mitchell *et al.*, 1961, demonstrem a capacidade do fungo aderir e germinar em matéria vegetal viva, sendo a aderência proporcional à quantidade de água dos locais de adesão. Para que este fungo colonize a matéria vegetal morta é necessário que esta não tenha sido anteriormente colonizada por outros fungos saprófitas, uma vez que há fungos colonizadores que, tendo temperaturas ótimas de crescimento mais baixas, se estabelecem no substrato em primeiro lugar, impedindo ou retardando o desenvolvimento de *P. chartarum* (Brook, 1963).

Em locais colonizados por *P. chartarum*, face a condições físicas e climáticas adversas, o fungo entra em senescência, vindo a esporulação a ocorrer em meados do Verão quando a deposição de matéria vegetal morta é maior, proporcionando maior quantidade de substrato disponível para o desenvolvimento do fungo. Quando o corte das pastagens ou culturas se faz tardiamente ou o período que medeia o corte e ensilagem/enfardamento é maior, a acumulação temporária de matéria vegetal contribui para aumentar o número de esporos na pastagem e/ou ensilagem, tornando-se estas mais tóxicas (Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Com a queda da curva de crescimento das plantas ao iniciar-se o Verão, as que têm capacidade para realizar tal processo, florescem. Após o amadurecimento das sementes, os caules das plantas que suportam flores e sementes caem ao solo, formando detritos vegetais que propiciam ao desenvolvimento de *P. chartarum*. Mais tarde, também, os restantes caules, não ligados à floração, se depositam no solo, potenciando a matéria vegetal morta já existente disponível para o desenvolvimento do fungo. Quanto maior altura uma pastagem apresentar, maior a quantidade de matéria vegetal morta que se acumulará junto ao solo (Brook, 1963).

A utilização de espécies anuais ou de uma associação de espécies anuais e perenes nas pastagens, a ocorrência de Verões quentes, um baixo encabeçamento da pastagem na fase anterior ao período de risco para o aparecimento de pitomicotoxicose, a existência de sombra exercida por plantas mais altas, o corte de erva deixando que esta se acumule junto ao solo ou a propagação de pragas (por exemplo, insetos ou fungos) proporcionam a existência de matéria vegetal morta, o que predispõe para a proliferação dos esporos de *P. chartarum* (Thorton & Sinclair, 1960; Brook, 1963; Edwards *et al.*, 1981).

As pastagens de *Lolium perene* - azevém perene - são ideais para o desenvolvimento de *P. chartarum*, uma vez que esta planta tem tendência para acumular matéria vegetal morta ao nível

do solo e possui grande quantidade de azoto e outras substâncias solúveis, o que possibilita a criação de condições ideais, a nível de substrato, para a esporulação (Mitchell *et al.*, 1961; Brook, 1963; Dairy Australia FE Working Group, 2013), justificando o facto desta ser a planta mais encontrada nas pastagens onde ocorrem surtos de pitomicotoxicose. Outras plantas, como *Panicum repens* - escalracho, *Dactylis* spp. - pé-de-galo, *Holcus* spp. - erva-lanar - e *Cynosurus* spp. - rabo de cão - também proporcionam a acumulação, junto ao solo, de matéria vegetal morta (Farmer Levies, 2011). As pastagens compostas por outras espécies de plantas como *Trifolium* spp. - trevo, *Paspalum* spp. - grama de ponta, e *Festuca arundinaceae* – erva carneira, contêm menor número de esporos, dado que a deposição de matéria vegetal morta é menor (Dairy Australia FE Working Group, 2013; UTAD, 2015).

#### 1.1.3.2.2. Temperatura e humidade

Aquando da descoberta do fungo *P. chartarum*, este foi associado aos climas tropicais, todavia quando foi relacionado com pitomicotoxicose, percebeu-se a sua distribuição cosmopolita, estando presente mesmo em locais temperados (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A germinação de *P. chartarum* pode ocorrer ao longo do ano, já a esporulação tem lugar a partir do meio do Verão e no Outono, pois é nestas estações que a coexistência de chuva, possibilitando elevada taxa de humidade (a duração de períodos em que a humidade é de 100% depende da precipitação - 4 a 6 mm (di Menna & Bailey, 1973), irrigação, duração das horas de sol, nebulosidade, humidade do solo e vento) e temperaturas noturnas elevadas, resultando em toxicidade elevada nas zonas de acumulação de matéria vegetal morta nas pastagens (Brook, 1963; Smith & O'Hara, 1978; Towers *et al.*, 1990; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Humidade relativa do ar igual ou superior a 80% (di Menna & Bailey, 1973) ou 90% (Pinto *et al.*, 2005) e temperaturas mínimas do solo superiores a 12°C (di Menna & Bailey, 1973), idealmente 18°C a 10,16 cm de profundidade (Brook, 1963), e do ar a 16°C, durante um período de pelo menos três dias consecutivos, representam condições climáticas favoráveis à esporulação de *P. chartarum*. Mas é a 24°C e com cerca de 100% de humidade relativa, durante pelo menos 16 horas, que a esporulação atinge o seu máximo (Brook, 1963; Rodríguez *et al.*, 2010). A manutenção de uma amplitude térmica diária não superior a cinco graus Celsius também é um fator importante na produção de esporos. Perante as condições climáticas referidas, as quais são favoráveis ao desenvolvimento de *P. chartarum*, este encontra-se em vantagem em relação a outros fungos saprófitas, podendo estabelecer-se de forma mais eficiente (Taylor, 1971 e Athernthon *et al.*, 1974 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

A matéria vegetal morta, que constitui a maioria das pastagens no final do Verão, permite que a água proveniente da precipitação não evapore e se mantenha elevada humidade junto ao solo,

mesmo em dias de sol, quando a erva seca providencia isolamento impedindo a evaporação (Taylor, 1971 e Athernthon *et al.*, 1974 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

O aquecimento global que se faz sentir no planeta Terra pode afetar a incidência de pitomicotoxicose, pois se a temperatura média aumentar sem que existam alterações na quantidade de precipitação, poderão haver casos a altitudes mais elevadas e em momentos fora dos períodos críticos anuais (di Menna *et al.*, 2009; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

#### 1.1.3.3. Dinâmica dos esporos e esporidesmina na pastagem

A dispersão dos esporos é totalmente passiva, sendo a nível local implicado o movimento ou agitação das plantas. Já a remoção e dispersão dos esporos no ar deve-se à ocorrência de vento na presença de humidades relativas baixas (Brook, 1963; Brook, 1969). Os esporos não são arrastados pela água da chuva (Dairy Australia FE Working Group, 2013), contrariamente ao enunciado por di Menna & Bailey, 1973, que afirmam que os esporos são removidos pela água, pela micro e macro fauna que os ingere e são destruídos aquando da germinação e das alterações osmóticas resultantes da dissecação.

Ao ter em conta a localização da pastagem em termos de relevo do terreno, as colinas são locais de maior risco do que as planícies (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Na Nova Zelândia, um estudo mostrou que, quanto maior a distância das explorações à costa, menor o risco de pitomicotoxicose (Faull, 1991).

A radiação UV aumenta a taxa de esporulação do fungo e a produção de esporidesmina, contudo destrói a micotoxina quando esta se encontra em solução aquosa após lixiviação a partir do micélio senescente (di Menna *et al.*, 1970). A diminuição de toxicidade pela ação de raios UV (Clare & Gumbley, 1962) ou de radiação solar numa solução aquosa de esporidesmina já tinha sido apontada anteriormente por Clare & Mortimer, 1964. A degradação de esporidesmina, na presença de água e com incidência de luz solar, é completada em uma a três horas (Clare & Gumbley, 1962; Marbrook & Matthews, 1962).

Mesmo com a chegada de uma estação mais fria os esporos permanecem na pastagem algum tempo, ainda que o ciclo de vida possa parar. A duração exata da permanência de esporidesmina nos esporos, após a esporulação, não está definida (Dairy Australia FE Working Group, 2013), contudo a solubilidade da toxina em água e a ação da radiação solar sobre os esporos podem influenciar a perda de esporidesmina ou na sua conversão em substâncias não tóxicas (Clare & Gumbley, 1962; Marbrook & Matthews, 1962).

#### 1.1.3.4. Identificação e previsão da toxicidade da pastagem

O teste da proveta foi o primeiro teste que demonstrou a toxicidade das pastagens onde apareciam casos de pitomicotoxicose (Percival, 1959b).

Mesmo antes da identificação da micotoxina esporidesmina como agente etiológico da pitomicotoxicose, já se tinha percebido em que condições climáticas esta doença aparecia (Mitchell *et al.*, 1959; Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A par da necessidade de temperatura e humidade favoráveis, está a necessidade de substrato, a que se junta o nível de intensidade de pastoreio suficiente para que seja ingerido número suficiente de esporos para desencadear a doença (Smith & Towers, 2002).

O início e o final do período de risco de pitomicotoxicose não são fixos, podendo este ter uma duração de mais de 100 dias. O aparecimento da doença pode não coincidir com o início das condições meteorológicas compatíveis para o seu desenvolvimento, uma vez que é preciso ter em conta a quantidade de matéria vegetal morta da pastagem, assim como a existência de outros fungos saprófitas. Além disso, o pico de desenvolvimento inicial na época de risco pode não ser suficiente para atingir o número de esporos necessário para desencadear o aparecimento de casos de pitomicotoxicose (Brook, 1963), pois cada período, com condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo, proporciona um incremento do número de esporos, sendo essa quantidade de esporos o ponto de partida para o período seguinte, viabilizando-se a existência de número de esporos suficiente para desencadear a doença após dois ou três períodos de condições climáticas propícias (Farmer Levies, 2011). Assim a incidência anual da doença é bastante variável, uma vez que depende de fatores bastante variáveis, entre eles o clima (Smith & O'Hara, 1978).

Após uma mudança climática adversa, os esporos da pastagem perdem toxicidade em uma a duas semanas (Van der Graaff, 1998).

Um aumento do número de esporos na pastagem no final do Outono pode levar ao aparecimento de mais casos em comparação com o final do Verão/início do Outono porque os animais, provavelmente, já possuem lesões hepáticas logo haverá exacerbação dos sinais clínicos manifestados (Smith & O'Hara, 1978; Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

Quanto mais elevada for a intensidade de pastoreio, em época de risco, numa pastagem contaminada, maior será o consumo de matéria morta vegetal, pois o pastoreio far-se-á mais próximo do solo, logo mais elevada a ingestão de esporos (Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Assim, numa pastagem com plantas altas, a probabilidade de intoxicação por esporidesmina é mais baixa desde que a intensidade de pastoreio não obrigue os animais a consumir alimento junto ao solo. Sob estas condições é comparativamente mais perigoso pastorear os animais em pastagens com plantas baixas, tendo acesso ao consumo inevitável de matéria vegetal contaminada com *P. chartarum* (Smith *et al.*, 1963).

É importante referir que animais estabulados alimentados com feno, cuja origem são pastagens contaminadas com *P. chartarum*, podem sofrer lesões hepatobiliares e mesmo fotossensibilidade se tiverem acesso a locais expostos à luz solar (Rodríguez *et al.*, 2010).

A Figura 7 e Tabela 5 mostram a distribuição do número de esporos/g de matéria seca em cada parte da planta que compõe a pastagem; quanto mais afastado se está do nível do solo (onde a acumulação de matéria vegetal morta é máxima) menor é o número de esporos (Dairy Australia FE Working Group, 2013). No Gráfico 1 é possível perceber a relação entre o número de esporos da pastagem, a época do ano e a curva de crescimento das plantas. No final do Verão é quando se verificam contagens mais elevadas de esporos nas pastagens (Brook, 1969).

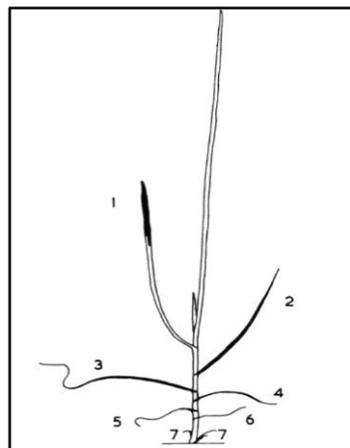


Figura 7: Distribuição do n.º de esporos por grama de erva seca nas plantas de *Lolium perene*, ver Tabela 5 (Brook, 1963)

Tabela 5: Número de esporos/g de erva seca a que corresponde cada número da Figura 7 (adaptado de Brook, 1963)

Folha	1	2	3	4	5	6	7
Esporos/g de erva seca	243 000	521 000	1 125 000	2 018 000	786 000	786 000	555 000

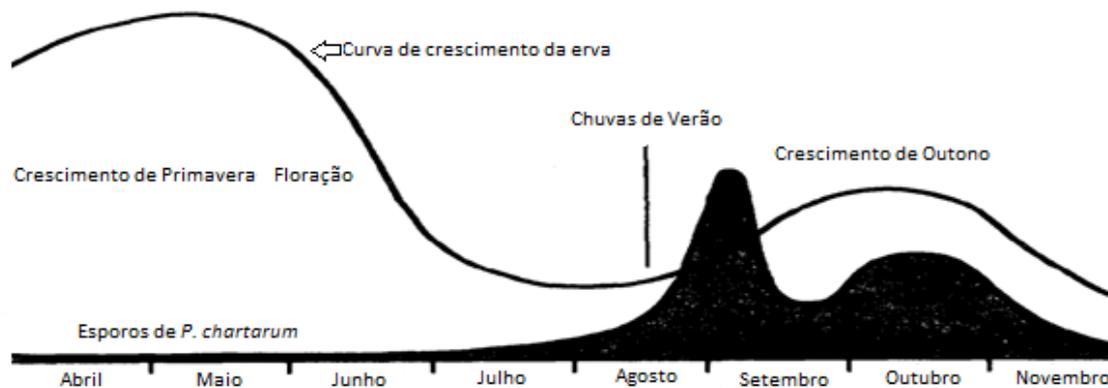


Gráfico 1: Relação entre o crescimento da erva da pastagem e o desenvolvimento de *Pithomyces chartarum* na Nova Zelândia (adaptado de Brook, 1969)

A toxicidade de uma pastagem depende da densidade de esporos presentes, da capacidade do *P. chartarum* produzir a micotoxina esporidesmina (Collin *et al.*, 1998) e da idade dos esporos presentes na pastagem, sendo o risco de intoxicação para os animais acrescido com a intensidade do pastoreio, com a altura da pastagem, com a exposição anterior dos animais à esporidesmina, com a suscetibilidade das diferentes raças e indivíduos e com o período temporal em que há consumo de esporos tóxicos (Rammel, 1991; Handcock, 2012).

#### 1.1.3.4.1. Monitorização das condições meteorológicas

A previsão dos períodos de risco de desenvolvimento de pitomicotoxicose assente unicamente na avaliação meteorológica não permite uma avaliação correta da toxicidade da pastagem, pois além de possuir o registo das temperaturas e humidades, é necessário saber durante quanto tempo essas se fizeram sentir (di Menna & Bailey, 1973), além de que o fator relativo ao substrato, neste caso a existência de matéria vegetal morta, visto tratar-se de um fungo saprófita, é também fulcral para o desenvolvimento do fungo (Thorton & Sinclair, 1960). A monitorização de humidade relativa e temperatura do ar é insuficiente, tendo em conta que outros fatores como a irrigação e humidade dos solos, duração das horas de sol diárias, vento e taxa de nebulosidade, são importantes na determinação dos períodos de risco (Brook, 1963). Assim, hoje em dia a previsão, exclusiva, das épocas de risco de pitomicotoxicose, com base em dados climáticos não é aconselhada (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

#### 1.1.3.4.2. Monitorização do número de esporos

A contagem de esporos pode ser aferida em dois locais: pastagem e fezes. A contagem de esporos da pastagem permite estimar a quantidade de esporos ingerida por grama de erva consumida, enquanto a contagem de esporos das fezes avalia a quantidade de esporos consumida por um animal em concreto, mensurando-se o risco específico para aquele animal. Normalmente, as contagens de esporos das fezes são mais elevadas do que as contagens da pastagem, contribuindo para esse facto a pressão de pastoreio. Tendo a contagem de esporos das fezes necessidade de estudos que padronizem com maior exactidão os seus valores, aconselha-se o uso da contagem de esporos da pastagem como método de eleição para avaliação do risco de desenvolvimento de pitomicotoxicose (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

O número de esporos presentes numa pastagem resulta do equilíbrio entre a taxa de produção e de destruição dos mesmos (di Menna & Bailey, 1973). No início do estudo desta doença, considerava-se que contagens acima de 400000 esporos/g de erva provocavam lesões hepatobiliares graves (Thorton & Sinclair, 1960) e que pelo menos 100000 esporos/g de erva eram necessários para desencadear lesões no sistema hepatobiliar, tendo o último valor sido fixado como indicativo de uma pastagem perigosa para os animais que a pastoreiam (Sinclair, 1961; di Menna, 1977 referido por Collin *et al.*, 1995). Posteriormente, contagens de esporos na pastagem acima de 200000 esporos/g de erva indicavam pastagem contaminada com perigo de doença (Chapman & di Menna, 1981). Mais recentemente, estudos estabeleceram que contagens de esporos de 40000 esporos/g de erva podem desencadear fotossensibilidade, já valores de 100000 esporos/g de erva podem causar insuficiência hepática e mesmo morte nos animais (Smith & Towers, 2002; Rodríguez *et al.*, 2010; Farmer Levies, 2011). Atualmente, os

valores de contagem de esporos na pastagem indicativos de perigo são os referidos na Tabela 6, estando também mencionados os valores de contagem de esporos nas fezes.

Tabela 6: Classificação do risco de aparecimento de pitomicototoxicose consoante as contagens de esporos da pastagem e das fezes (adaptado de Mulvaney, 2011 referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013)

<b>Risco</b>	<b>Contagem de Esporos da Pastagem (n.º de esporos / g de erva)</b>	<b>Contagem de Esporos das Fezes (n.º de esporos / g de fezes)</b>
Elevado	80 000 – 100 000 esporos/g	600 000 – 1 000 000 esporos/g
Moderado	20 000 – 80 000 esporos/g	100 000 – 600 000 esporos/g
Baixo	0 – 20 000 esporos/g	0 – 100 000 esporos/g

Cada exploração deveria, idealmente, fazer a contagem semanal de esporos das suas pastagens, isto porque as contagens variam consideravelmente na mesma área, em explorações diferentes e mesmo em parcelas da mesma exploração (Dairy Australia FE Working Group, 2013), uma vez que a quantidade de substrato presente, assim como o microclima que se faz sentir influenciam o grau de esporulação do fungo (Thorton & Sinclair, 1960). A existência de explorações sentinela, onde a monitorização da contagem de esporos da pastagem se faça de forma constante e em intervalos regulares permite criar uma rede de controlo para que, em caso de aumento considerável do número de esporos, se emita um alerta transmitindo-o às restantes explorações a fim de que estas providenciem cautelas (Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A contagem de esporos, quer da pastagem quer das fezes, não tem em conta o efeito cumulativo da esporidesmina, pois um animal que ingira durante dez dias 10000 esporos/dia está exposto a toxicidade equivalente a um animal que ingira 100000 esporos num dia (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Quando a contagem de esporos da pastagem ronda os 20000 esporos/g de erva e as condições atmosféricas são favoráveis à esporulação, devem iniciar-se os meios preventivos no combate à pitomicototoxicose (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

#### 1.1.3.4.2.1. Método de contagem de esporos - “Método de Lavagem”

A contagem dos esporos, quando a estirpe é produtora de esporidesmina, é um método muito eficaz para aferir a toxicidade de uma pastagem, uma vez que quanto mais elevada for a esporulação maior a quantidade de micotoxina produzida (di Menna *et al.*, 1970).

O primeiro método desenvolvido para avaliar a quantidade de esporos na pastagem foi o de Brook, 1959, que consiste num aparelho volumétrico móvel, que ao passar pela pastagem, recolhe os esporos que esta possui, estimando-se a quantidade de esporos da pastagem em metros cúbicos de ar. Só pode ser usado em pastagem seca e curta (Brook, 1959). O método mais utilizado na contagem de esporos, tanto da pastagem como das fezes, é o elaborado por

Thorton e Sinclair em 1960 (método de lavagem) (Thorton & Sinclair, 1960; Dairy Australia FE Working Group, 2013), tendo este sofrido várias alterações posteriormente (di Menna & Bailey, 1973; Oldman & di Menna, 1983). A comparação entre o método enunciado por Brook, em 1959, e o de Thorton & Sinclair, em 1960, do ponto de vista estatístico não revelou diferenças, contudo, o autor do estudo acha mais prático o uso do aparelho móvel pois é mais rápido, não há necessidade de guardar erva para proceder à contagem e permite a elaboração de *slides* instantâneos e permanentes (Sinclair, 1961). Por outro lado, o método de Brook (1959) é indicado como um bom método para mensurar os esporos que estão aptos para dispersão mas não revela a variação da esporulação do fungo na pastagem (Smith *et al.*, 1961).

#### 1.1.3.4.2.1.1.Colheita de amostras

A colheita de amostras para submeter ao método de lavagem deve ser feita sempre nas mesmas áreas de terreno, devendo ser escolhidos dois locais da exploração que representem os diferentes tipos de terreno (planícies e colinas ou planaltos). Nesses locais delimita-se uma linha que atravesse diagonalmente todo o terreno, evitando-se árvores, divisões ou cercas. Tal linha servirá de guia para a recolha das diversas amostras ao longo do tempo. Utilizando uma tesoura ou a própria mão deve recolher-se erva cerca de um centímetro acima do nível do solo, repetindo-se a colheita a cada 10-15 passos ( $\approx 10\text{m}$ ) na linha pré-definida, num total nunca inferior a cinco amostras até se obter cerca de 200g de erva, a qual deve ser acondicionada em saco de papel que mencione a data e nome da exploração, o nome e tipo de terreno e localização geográfica. A expedição para o laboratório deve ser tão rápida quanto possível (Thorton & Sinclair, 1960; di Menna & Bailey, 1973; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Na colheita da amostra deve evitar-se a recolha de qualquer planta em especial. Pedacos de solo que, por vezes, são recolhidos com a amostra, dificultam a análise, devendo ter-se cuidado no momento da colheita para evitar a sua mistura com as plantas (Oldman & di Menna, 1983).

#### 1.1.3.4.2.1.2.Material

- Câmara de Neubauer (0,1 mm de profundidade;  $1 \times 10^{-4}$  ml)
- Microscópio binocular
- Goblet
- Proveta
- Balança
- Peneira (2 mm)
- Água
- Detergente Teepol

### 1.1.3.4.2.1.3.Descrição

**Tabela 7: Descrição do método original de contagem de esporos e suas atualizações**

(Thorton & Sinclair, 1960)	(di Menna & Bailey, 1973)	(Oldman & di Menna, 1983)
Coloque 25 g da amostra de erva recolhida num recipiente e adicione 250 mL de água com uma gota de detergente Teepol. Agite durante um minuto.	Coloque 25 g da amostra de erva recolhida num recipiente e adicione 250 mL de água. Agite durante cinco minutos.	Coloque 60 g de amostra de erva recolhida num recipiente e adicione 600 mL de água. Agite durante três minutos.
Filtrar o preparado através de uma peneira de 2 mm. Preencha a câmara de Neubauer com a água filtrada.	Preencha a câmara de Neubauer com a água proveniente da lavagem sem filtrar.	
Utilize a objetiva de 100x para contagem dos esporos.		
Conte os esporos contidos nas cinco divisões (quatro divisões dos cantos e uma central) de cada hemocitômetro da câmara de Neubauer, incluindo aqueles que tocam os limites inferiores e direitos de cada divisão e ignorando os esporos que tocam os limites superiores e esquerdos de cada divisão. Deve observar 20 divisões.		

Após a contagem (Tabela 7), o cálculo do número de esporos, com base, por exemplo, no método de Oldman & di Menna, 1983, efetua-se da seguinte forma: cada divisão tem um volume de 0,1 mm<sup>3</sup>, observando-se 2 mm<sup>3</sup> da amostra ao analisar 20 divisões (duas câmaras). Um esporo na análise (2 mm<sup>3</sup>) corresponde a 300000 esporos na amostra total de 600000 mm<sup>3</sup> de água onde estão 60 g de erva, o que corresponde a 5000 esporos em uma grama de erva (Oldman & di Menna, 1983).

Na observação microscópica é provável o aparecimento de esporos de outros fungos que, por vezes, podem ser confundidos com esporos de *P. chartarum* (Figura 8) (Oldman & di Menna, 1983).

### 1.1.3.4.3.Mensuração da esporidesmina da pastagem

A variação na toxicidade dos isolados provenientes de um mesmo país, sugere a necessidade de avaliação da produção de esporidesmina, de modo a permitir a confirmação do agente etiológico (Collin *et al.*, 1998a). A avaliação da toxicidade de um isolado permite estimar, em parte, o risco da exposição dos animais à micotoxina da pastagem (Done *et al.*, 1961 e di Menna, *et al.*, 1970 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

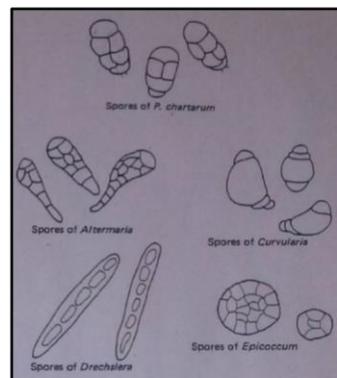


Figura 8: Diferentes géneros de esporos passíveis de confusão com esporos de *P. chartarum* (Oldman & di Menna, 1983)

Com a possibilidade da não correspondência entre o número de esporos na pastagem e o grau de toxicidade da mesma, várias foram as tentativas de desenvolvimento de métodos de mensuração de esporidesmina no terreno (Collin & Towers, 1995a). Contudo, os métodos estudados não permitiram atingir a sensibilidade necessária para a detecção de esporidesmina numa avaliação em contexto prático. Em 1998, foi publicado um estudo em que estiveram à prova vários testes com o objetivo de se criar uma técnica capaz de ser utilizada no campo. O teste baseado em técnicas de imunofiltração foi aquele que garantiu maior sensibilidade na detecção de esporidesmina, ainda que a logística necessária para a sua realização necessite de minimização, de forma a ser mais executável (Collin *et al.*, 1998b).

#### 1.1.3.5.Epidemiologia

O fungo *P. chartarum* pode ser encontrado na Europa, América do Norte e do Sul, África do Sul e Oceânia, porém, é na Nova Zelândia que este adquire maior importância, uma vez que se encontra em abundância nas pastagens deste país, sendo que 95% das estirpes aqui encontradas são tóxicas (Collin & Towers, 1995a; Collin *et al.*, 1998a). Os isolados da América diferem dos isolados provenientes da Nova Zelândia, Austrália e África do Sul, uma vez que a capacidade para produzirem esporidesmina em meio laboratorial é menor, ainda que a sua origem esteja associada a pastagens onde os animais apresentaram fotossensibilidade. Deduz-se, que ou a fotossensibilidade desses animais não está relacionada com *P. chartarum* ou se está, esta não se deve à esporidesmina (Brewer *et al.*, 1989).

Em 1959 surge a primeira referência à pitomicotoxicose na Austrália (Janes, 1959).

Na Nova Zelândia o estudo de seis isolados em 1962 (Dingley *et al.*, 1962 referido por Collin *et al.*, 1998a), de 37 isolados em 1970 (di Menna *et al.*, 1970) e de outros 21 em 1991 (di Menna, *et al.*, 1991 referido por Collin & Towers, 1995a), demonstrou a sua toxicidade, pela produção de esporidesmina, em todos os analisados. Em 1995, pela primeira vez, numa análise de 676 isolados, foram detetados dois sem produção detetável de esporidesmina (Collin & Towers, 1995a). Em 1998, Collin *et al.* estudaram amostras de *P. chartarum*, oriundas de vários países, quanto à sua toxicidade e concluíram que 86% (95% sem contar com uma amostra de baixa toxicidade) das 391 amostras da Nova Zelândia, 67% de 207 da Austrália, 28% de 182 do Uruguai e 2% de 51 do Brasil eram tóxicas (Collin *et al.*, 1998a).

Um estudo de 1980, mostrou que menos de 25% dos 167 isolados na África do Sul produziam esporidesmina, não sendo mencionada a relação entre a taxa de esporulação e a produção de micotoxina (Kellerman *et al.*, 1980 referido por Collin & Towers, 1995a).

Em 1962 foi identificado o fungo na Grã – Bretanha (Lacey & Gregory, 1962), contudo não lhe foi imputada responsabilidade nos casos de fotossensibilidade verificados no país (Lacey, 1975), não obstante confirmou-se a presença de esporidesmina nos isolados com esporulação mais

intensa (Gregory & Lacey, 1964). Já em 1982 foi, pela primeira vez, confirmada a existência de pitomicotoxicose em ovinos na Europa, mais especificamente no País Basco, França (Bézille *et al.*, 1984 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Bonnefoi *et al.*, 1989), onde a doença é considerada endêmica (Le Bars & Le Bars, 1996). O estudo de dez isolados oriundos de França, revelou que apenas três apresentavam elevada esporulação e conseqüente produção de esporidesmina em teor elevado (Le Bars *et al.*, 1990 referido por Collin *et al.*, 1998a).

Entre 1999 e 2001, registaram-se na Ilha Terceira e Ilha de S. Miguel, Arquipélago dos Açores, Portugal, 23 surtos de fotossensibilidade (22 em bovinos e um em ovinos), tendo-se confirmado a esporidesmina como agente etiológico da doença. Nas explorações afetadas, 11,4% dos bovinos desenvolveram sintomatologia, tendo um rebanho de ovinos da raça Segureña apresentado uma taxa de mortalidade de 20,8%. A análise, através do método ELISA e posterior confirmação com cromatografia líquida de alto rendimento, de 381 amostras de *P. chartarum* revelou toxicidade em todos os isolados, isto é, todas as amostras analisadas eram produtoras da micotoxina esporidesmina (Pinto *et al.*, 2005).

Já no Novo Milênio, houve o registo do primeiro surto de pitomicotoxicose na Holanda (Van der Wuijckhuise *et al.*, 2006 referido por di Menna *et al.*, 2009), e em 2005 foi identificado pela primeira vez na Turquia, em 22 ovinos cruzados de Merino distribuídos por cinco rebanhos, cada um tendo entre 150 a 200 animais. O surto resultou em 3% de mortalidade e as contagens de esporos na pastagem variaram entre 96300 e 267500 esporos/g de erva (Ozmen *et al.*, 2008).

Em vários episódios de fotossensibilidade no Texas, foram encontrados esporos de *P. chartarum* nas pastagens (Taber *et al.*, 1968 referido por Clive *et al.*, 1981), não obstante nenhuma das tentativas para isolar a esporidesmina foi frutífera (Ueno *et al.*, 1974 referido por Clive *et al.*, 1981), verificando-se a avirulência das estirpes locais, ainda que o nível de esporulação fosse superior aos isolados de origem neozelandesa (Clive *et al.*, 1981). A avaliação laboratorial de 57 isolados da América (Norte e Sul), dos quais apenas 21 esporularam, voltou a indicar a não produção de esporidesmina pelas estirpes ali encontradas (Brewer *et al.*, 1989).

Durante a década de 70, no Brasil, o aparecimento de surtos de fotossensibilidade foi atribuído à esporidesmina, contudo ao longo do tempo os dados anatomohistopatológicos recolhidos, assim como a não confirmação da toxicidade, ou sequer da existência, por vezes, de esporos de *P. chartarum* veio a atribuir a etiologia dos casos de fotossensibilidade à planta *Brachiaria decumbens*, a qual foi confirmada (Seixas, 2009).

Nas plantas, o fungo está relacionado com manchas (*glume blotch*) no grão de arroz (*Oryza sativa*) e sorgo (*Sorghum* spp.) (Haware & Sharma, 1973 referido por Collin *et al.*, 1998a).

Nos animais a susceptibilidade à pitomicotoxicose é bastante variável entre espécies, entre raças da mesma espécie e entre indivíduos da mesma raça, sendo a resistência ou susceptibilidade à

doença hereditária (Morris *et al.*, 2004). As taxas de morbidade e mortalidade são bastante variáveis, de 0 a 100%, o que pode dever-se à dependência das condições climáticas no desenvolvimento do fungo (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988), à suscetibilidade/resistência própria a cada animal (Campbell *et al.*, 1981), à ingestão do fungo heterogeneamente distribuído pela pastagem, aos diferentes graus de toxicidade do fungo presente na pastagem e à quantidade de esporos ingerida por cada animal (Bonnefoi *et al.*, 1989).

A pitomicototoxicose afeta, na natureza, animais de produção como ovinos, caprinos, bovinos e cervídeos (Phua *et al.*, 2008; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os ovinos, gamos (*Dama dama L.*) e alpacas (*Vicugna pacos*) são as espécies mais sensíveis, enquanto os bovinos, veados (*Cervus elaphus*) e lamas (*Lama glama*) demonstram susceptibilidade intermédia. Os caprinos são os mais resistentes entre ruminantes. Os ratos são mais resistentes do que os ruminantes e os equinos parecem mesmo não mostrar qualquer susceptibilidade à esporidesmina (Smith *et al.*, 1997; Smith & Towers, 2002; Morris *et al.*, 2004). O primeiro caso em herbívoros marsupiais foi descrito em 2005 num canguro (*Macropus giganteus*) (Hum, 2005).

#### 1.1.3.5.1. Bovinos

Em 1974 foi reportado o primeiro caso observado em bovinos (Dairy Australia FE Working Group, 2013), sendo a raça Jersey mais suscetível do que a raça Frísia (Morris *et al.*, 1998).

#### 1.1.3.5.2. Ovinos

Os ovinos, das espécies estudadas, são a que maior suscetibilidade apresenta à esporidesmina (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Nos ovinos o processo de desintoxicação da esporidesmina A parece envolver a quebra da ponte dissulfeto (Fairclough & Smith, 1983).

A capacidade de metabolismo do sistema microssomal hepático serviu de comparação entre ovelhas selvagens, das quais descende a raça Merino, e carneiros e borregos de raça Romney, concluindo-se que a eficiência do metabolismo das ovelhas selvagens era maior (Fairclough *et al.*, 1978). Em 1980, um estudo envolvendo ovinos da raça Merino, Romney, Border Leicester e cruzados de Romney x Border Leicester, mostrou que a raça Merina era a mais resistente à pitomicototoxicose, possivelmente, devido à superior atividade do sistema microssomal hepático no metabolismo de substâncias (Smith *et al.*, 1980). Já em 1981, Edwards *et al.* constataram, através da análise de um surto em ovinos que 81% dos animais afetados pertenciam à raça Merino, sendo outros 15% cruzados de Merino; de entre estes, 72% eram fêmeas adultas e 24% eram machos castrados. Neste caso, a taxa de mortalidade média nos rebanhos foi de 10,7% e a taxa de morbidade média foi de 38,7%. (Edwards *et al.*, 1981). A suscetibilidade da raça Merina à fotossensibilidade, deve-se em parte, à pele fina e estrutura do pelo dos animais desta raça (Smith *et al.*, 1987). A análise de dois estudos sobre a resistência das raças Finnish Landrace, Romney, East Frisian e dos seus cruzamentos, concluiu que a raça Finnish Landrace

é a mais resistente, seguida do cruzamento desta raça com a raça Romney, depois o cruzamento da East Frisian com a Romney, ainda a linha de Romney resistente cruzada com Romney e, por fim, a linha Romney controlada cruzada com Romney (Morris *et al.*, 2001).

#### 1.1.3.5.3. Caprinos

Os caprinos são, no geral, mais resistentes à pitomicotoxicose do que os ovinos (Smith *et al.*, 1987; Smith & Embling, 1991). A raça Saanens é a mais suscetível, seguindo-se a raça Angora juntamente com as cabras selvagens necessitando duas a quatro vezes e quatro a oito vezes a dose de esporidesmina aplicada aos ovinos, respetivamente, para que desenvolvam lesões similares *in vitro*. Estas conclusões acerca da resistência podem ser mais significativas em condições naturais, tendo em conta os hábitos alimentares dos caprinos (*browsing behaviour*), que diminuem a probabilidade do consumo de esporos junto ao solo. Também, o facto de possuírem um aparelho enzimático microssomal do fígado mais ativo, possibilita um metabolismo de substâncias mais eficaz. O menor armazenamento de cobre (Cu) no fígado de caprinos, comparativamente aos ovinos, pode explicar em parte a maior resistência dos caprinos à pitomicotoxicose (Smith & Embling, 1991).

#### 1.1.3.5.4. Animais de laboratório

Os animais de laboratório são mais resistentes aos efeitos da esporidesmina do que os ruminantes (Munday *et al.*, 1993). Os porquinhos-da-Índia são a espécie mais suscetível à esporidesmina, já os ratos são dos mais resistentes (Wright & Forrester, 1965; Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Os ratos além de mais resistentes do que os porquinhos-da-Índia e do que os coelhos, manifestam maior resistência entre a população masculina (Rimington, *et al.*, 1962; Mortimer, 1970), aparentemente devido a uma maior desintoxicação da micotoxina nos machos (Rimington *et al.*, 1962). Os coelhos e porquinhos-da-Índia apresentam lesões hepáticas características quando ingerem erva contaminada ou cultura pura do fungo, ou ainda quando lhes é administrado um extrato tóxico na veia porta. Os coelhos desenvolvem o mesmo tipo de lesões do que os ovinos e porquinhos-da-Índia, contudo estas têm carácter mais agudo (Dodd, 1960; Worker, 1960; MacKinnon & Te Punga, 1961).

#### 1.1.3.6. Patogenia

A ação da micotoxina esporidesmina é inespecífica, apresentando variações de toxicidade nas diferentes espécies consoante os processos metabólicos de excreção a que é submetida (Mortimer & Stanbridge, 1968; Bullock *et al.*, 1974).

O consumo de pastagem ou feno contaminado com *P. chartarum*, proporciona a ingestão de esporos contendo esporidesmina, a qual se liberta dos esporos e é absorvida no trato gastrointestinal, entra na circulação enterohepática, chega ao fígado onde é concentrada na biliar (Worker, 1960; Mortimer & Stanbridge, 1968; Rammel, 1991; Smith & Towers, 2002). O principal

local da ação tóxica da esporidesmina é o epitélio dos ductos biliares provocando necrose severa e posterior inflamação, espessamento da parede dos ductos e eventual bloqueio do fluxo biliar pelo tecido de granulação, que provoca colestase e diminuição da excreção de bÍlis, com posterior diminuição de produção da mesma (Munday, 1982; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Outros órgãos, como a glândula mamária e bexiga, a par do sistema hepatobiliar, também são afetados (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Quando a esporidesmina chega ao fígado entra num ciclo de oxidação-redução, desencadeando a produção de radicais livres de oxigénio intracelulares (radical superóxido, peróxido de hidrogénio e radical hidroxilo) que danificam a membrana das células do epitélio biliar (Munday, 1982; Munday, 1989; Phua *et al.*, 1999; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Mais especificamente, a toxicidade da esporidesmina parece ter origem na sua ponte dissulfeto (Middleton, 1974), a qual na presença de glutathiona (tiol mais abundante nos tecidos) reduzida e outros tióis das membranas celulares, se reduz, formando-se um ditiol (forma reduzida da esporidesmina). Este sofre auto oxidação pela redução de um eletrão do oxigénio molecular para o anião superóxido, formando-se muitas moléculas de superóxido radical com origem apenas numa molécula de esporidesmina (Figura 9). A esporidesmina, por si só, pode funcionar como composto redox, entrando num ciclo de redução/auto oxidação, com a glutathiona e outros tióis, formando-se também superóxido radical. A reação de auto oxidação é catalisada pelo cobre (ação 900 vezes mais potente do que o ferro), em baixas concentrações -0 e 50 µM-, e pelo ferro, livres ou ligados a aminoácidos. Concentrações altas de cobre, níquel, cobalto e manganês inibem a auto oxidação da forma reduzida da esporidesmina (Munday, 1982; Munday, 1984a.; Munday, 1984b; Munday, 1985; Morris *et al.*, 2004). O anião superóxido radical sofre dismutação para peróxido de hidrogénio e este, na presença de metais de transição com ação catalítica, reage com o superóxido formando o radical hidroxilo. Estas três entidades, superóxido, peróxido de hidrogénio e radical hidroxilo são designados por espécies ativas de oxigénio, causadores de lesões em sistemas biológicos (Morris *et al.*, 2004), sendo o radical hidroxilo a espécie ativa de oxigénio a desencadear as lesões iniciais devido à sua maior reatividade quando comparado com o superóxido radical e o peróxido de hidrogénio (Munday, 1987).

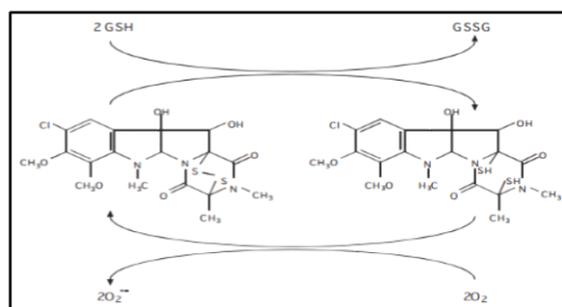


Figura 9: Ciclo de auto oxidação do ditiol, formado a partir de glutathiona reduzida e da ponte dissulfeto da esporidesmina reduzida (Morris *et al.*, 2004)

A formação reversível de compostos mercaptido entre certos metais e a esporidesmina reduzida inibe a produção de superóxido radical, dependendo do grau de estabilidade do composto formado, ao competir com a auto oxidação irreversível do tiol. A estabilidade dos compostos mercaptido, tendo em conta o metal, é de forma decrescente a seguinte: mercúrio  $\approx$  cádmio > bismuto > zinco > prata > antimónio > cobre > cobalto > níquel > arsénio (III) > chumbo > manganésio. Também cianidos e certos compostos orgânicos como o tolueno-3,4,-ditiol, dietilditiocarbamato, ditizona, fenantrolina, albumina sérica bovina, caseína e ovoalbumina têm a capacidade de inibir a produção de superóxido radical, pela ação quelante que exercem sobre o cobre (Munday, 1982; Munday, 1984a.; Munday, 1984b; Munday, 1985; Morris *et al.*, 2004).

Os dados clínicos (Coetzer *et al.*, 1983 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988), bioquímicos (Done *et al.*, 1962, Mortimer, 1962, e Mortimer, 1963 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Peters, 1963; Mortimer & Stanbridge, 1968) e anatomopatológicos (Mortimer & Taylor, 1962 e Mortimer, 1963 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Mortimer & Stanbridge, 1968), resultantes de estudos laboratoriais em que se administrou 1 mg de esporidesmina por Kg de pv, evidenciam a existência de duas fases de lesão hepatobiliar na intoxicação por esporidesmina (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Quando uma dose menor de esporidesmina é administrada (0,3 mg/Kg pv) os animais desenvolvem doença subclínica, sem sinais clínicos evidentes, registando-se alterações nas análises correspondentes ao perfil hepático e nas necrópsias realizadas a esses animais (Mortimer & Taylor, 1962, Mortimer, 1963 e Kellerman *et al.*, 1980 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

Na primeira fase, que se inicia com a administração de esporidesmina e se prolonga até uma ou duas semanas após, existe insuficiência hepática de cariz limitado sem a manifestação de sinais clínicos. Nesta fase a excreção biliar de esporidesmina faz-se a uma taxa elevada, resultando do contacto com a micotoxina a destruição das membranas das células expostas (Eakins, 1978). Quando as lesões atingem o domínio intracelular o metabolismo hepático fica alterado não só pela falha na conjugação dos ácidos biliares como na sua secreção, o que justifica o aparecimento de colestase intra-hepática no final da primeira fase. Esta destruição incita uma marcada resposta inflamatória, que se centra nos ductos biliares e diverge a partir destes (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A não produção e conjugação de ácidos biliares pode dever-se, em parte, à inibição da respiração das mitocôndrias provocada pela esporidesmina, pois o processo de síntese e conjugação requer energia para se realizar (Krocker *et al.*, 1977). Em condições *in vitro* a esporidesmina provoca aumento da permeabilidade mitocondrial com perda das coenzimas NAD, mas sem prejuízo da atividade das enzimas succinoxidase e citocromo c oxidase (Gallagher, 1964b).

Na segunda fase, a esporidesmina já não se encontra em circulação (Mortimer & Stanbridge, 1968) mas isso não impede que as lesões hepáticas se agravem (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A acumulação de ácidos biliares devido à colestase e a sua propagação pelo parênquima

hepático (danos nos hepatócitos) através de fissuras existentes nos canais biliares, propiciam uma reacção tecidual que culmina em fibrose e posterior cirrose (Mortimer & Taylor, 1962, e Mortimer, 1963 referidos por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Peters, 1963; Peters & Mortimer, 1970 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

Mortimer & Stanbridge, 1969, propuseram uma explicação sobre a diminuição bifásica da secreção de bÍlis: a primeira fase, que dura os primeiros cinco dias após a administração de esporidesmina deve-se à colangiolite inflamatória aguda, já a segunda fase que se inicia aos dez dias pós-administração está relacionada com colangiolite obliterante progressiva provocada pela proliferação de tecido de granulação envolvido no processo de recuperação.

A esporidesmina parece intervir na presença, número e arranjo das microvilosidades canaliculares (Bullock *et al.*, 1974), e no equilíbrio, hepático e do soro dos triglicéridos, ao inibir, não só a sua saída do fígado mas, também, a absorção para os tecidos dos que se encontram em circulação, o que parece dever-se à diminuição de atividade da lipoproteína lípase (Peters, 1966).

A toxicidade da esporidesmina também é verificada a nível renal, contudo em menor grau do que a nível hepático, uma vez que a excreção de esporidesmina pelo rim é muito menor do que no fígado (Mortimer & Stanbridge, 1968).

No timo observa-se uma regressão mais célere nos animais jovens afetados com a doença, o que os torna imunitariamente mais susceptíveis (Hove & Wright, 1969; Smith & Payne, 1991).

As lesões dermatológicas, em animais com pitomicotoxicose, chegaram a ser atribuídas à hipersensibilidade desenvolvida após o contato direto da pele dos animais com a esporidesmina na pastagem (Gallagher, 1964a).

A fitoporfirina incapaz de ser excretada, através da bÍlis, devido à pericolangite obstrutiva, acumula-se na circulação sistémica. Esta ao chegar à pele absorve a radiação UV provocando destruição das membranas celulares das células da pele e das mucosas, com inflamação subsequente, especialmente nos locais com pouca ou sem pigmentação, como na face, orelhas, lábios, vulva e úbere (Smith & O'Hara, 1978; Rammel, 1991; Phua *et al.*, 1999; Scheie *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). As moléculas de fitoporfirina excitadas pela luz solar reagem com oxigénio, formando oxigénio atómico ( $^1O_2$ ) e outras formas reativas de oxigénio. Sendo  $^1O_2$  o produto mais citotóxico resultante do processo fotoquímico, sendo sua meia vida curta e tendo uma difusão de apenas 10 a 20 nm, estima-se que a sua ação se concentre próximo do seu local de formação (Scheie *et al.*, 2002). A concentração de fitoporfirina na circulação sistémica depende da quantidade de clorofila que possui a alimentação, assim como da integridade dos mecanismos de funcionamento hepatobiliar (Campbell *et al.*, 2010). Um estudo sobre a análise de fitoporfirina em ovinos com

pitomicotoxicose revelou o aparecimento deste agente fotodinâmico na pele com um atraso de dois a três dias em relação ao plasma, o que pode dever-se às propriedades físicas e químicas da fitoporfirina ou à difusão característica da pele dos ovinos. Sendo a concentração de fitoporfirina no plasma, em animais saudáveis, inferior a 0,1 µmol/l, o aparecimento de fotossensibilidade ocorre quando o valor do agente fotodinâmico excede 0,3 µmol/l, podendo este valor variar consoante a intensidade luminosa ou a sensibilidade relacionada com a suscetibilidade da raça. A fitoporfirina exposta a luz solar não sofre fotodegradação. A concentração de bilirrubina em circulação correlaciona-se ( $R^2=0,80$ ) com os níveis de fitoporfirina (Scheie *et al.*, 2003).

A hipertrofia das glândulas adrenais em alguns dos ovinos e ratos usados em ensaios laboratoriais para o estudo de pitomicotoxicose (Mortimer & Taylor, 1962 referido por Smith & Payne, 1991), tal como a verificação do mesmo fenómeno em animais que morreram devido à fotossensibilidade provocada pela esporidesmina, insinuou o possível envolvimento do cortisol endógeno no processo inflamatório presente. No estudo levado a cabo por Smith and Payne, em 1991, desmonstrou-se que o aumento do tamanho das glândulas adrenais se relaciona com o incremento do cortisol no plasma, o qual é contemporâneo do aparecimento de fotossensibilidade e não do início de lesões hepáticas (Smith & Payne, 1991). A diminuição acrescida de glicogénio no fígado de animais com fotossensibilidade relativamente à diminuição em animais que ingeriram esporidesmina mas não apresentam fotossensibilidade, relaciona o *stress* que os animais fotossensíveis sofrem com a libertação de cortisol e com a depleção das reservas de glicogénio (Flaoyen & Smith, 1992). A falha do córtex adrenal pode ser coadjuvante na morte de animais em estado crítico devido a pitomicotoxicose (Smith & Payne, 1991).

#### 1.1.3.7. Sinais clínicos

Em animais que manifestam clinicamente a intoxicação, a FTS é o sinal clínico que mais alerta, esta deve-se a alterações hepáticas e ao bloqueio do normal fluxo biliar. A FTS aparece cerca de duas semanas (sete a 20 dias) após a ingestão de esporidesmina (di Menna *et al.*, 2009; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A FTS não é resultado da toxicidade direta da esporidesmina mas sim da patologia hepática causada pela micotoxina. Assim, animais totalmente negros também têm pitomicotoxicose, pois apresentam lesões hepáticas, ainda que por razões fenotípicas não o demonstrem dermatologicamente (Bézille *et al.*, 1984 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Dairy Australia FE Working Group, 2013). São os animais com lesões hepatobiliares mais graves que desenvolvem os sinais dermatológicos da doença (Towers & Stratton, 1978).

Nem todos os animais evidenciam FTS, contudo sofrem danos hepáticos e diminuição da produção de leite. Por cada animal com lesões na pele há dez animais com lesões hepáticas mas sem alterações da pele. Num estudo levado a cabo por Faull, em 1991, foram analisados

registos de 565000 vacas leiteiras, em que apenas 6% tinha lesões dermatológicas, já 38% apresentava alterações hepáticas; no relatório do Dairy Australia FE Working Group os números apontados são de 80% de animais sem sinais na pele e com lesões hepáticas. São os animais com lesões hepáticas mas sem alterações da pele que maior perda económica provocam nas explorações (Faull, 1991; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Outros estudos concluem que menos de 10% dos animais de um rebanho revelam sinais dermatológicos, enquanto 40 a 50% apresentam aumento da enzima hepática GGT, indicativa de lesão hepatobiliar (Towers, 1978; Davoudi, 2013). Nos ovinos afirma-se que a maioria dos animais afetados pela pitomicototoxicose não mostra qualquer sinal dermatológico (Towers *et al.*, 1990; Farmer Levies, 2011).

#### 1.1.3.7.1.Fase inicial

Os animais intoxicados apresentam diminuição de apetite, a qual ocorre num período muito curto após o consumo de esporidesmina, podendo a redução da ingestão chegar a 75% no consumo diário de alimento quando a dose de esporidesmina ronda 1 mg/Kg pv (Mortimer & Taylor, 1962 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Assim, a perda de peso dos animais é inevitável, acentuando-se este sinal clínico nos animais com lesões dermatológicas (Smith, 2000).

Antes de serem evidentes os sinais de FTS, os animais sofrem diarreia ligeira, cólicas, ansiedade, sialorreia e afastamento do resto do rebanho, assim como diminuição da produção de leite, contudo estes são sinais presentes numa vasta gama de doenças, sendo difícil para o produtor identificá-los como pródromos de pitomicototoxicose (Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A diarreia pode provocar desidratação, acompanhada de oligúria e hematúria (Mortimer & Taylor, 1962 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Hemoglobinúria e icterícia são visíveis em alguns dos animais, devido a uma crise hemolítica intravascular aguda (Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A icterícia é característica dos casos mais graves, nos quais, também se manifesta a forma dermatológica da doença (Smith, 2000).

Estudos no centro de investigações de Ruakura (décadas de 1970 e 1980), Nova Zelândia, mostraram que apenas uma exposição à esporidesmina é necessária para que se verifique uma diminuição na produção de leite, recuperando-se este parâmetro no quinto dia após a exposição. Contudo, se após a primeira exposição se verificar nova exposição num curto período de tempo, as perdas de produção são maiores e mais duradouras, mesmo em animais protegidos com zinco (ver 1.1.3.13.8.Profilaxia com zinco) são afetados pela segunda exposição. A diminuição de produção numa segunda dose de micotoxina é muito variável, o que se pode imputar a um fator genético subjacente (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os contactos repetidos com a esporidesmina parecem potenciar os efeitos que esta provoca, assim um primeiro contacto com a micotoxina parece desencadear um efeito maior num contacto posterior, sendo um animal

mais suscetível à ação de esporidesmina após um primeiro contacto com esta. Este efeito designa-se potenciação mas os seus mecanismos ainda não são totalmente conhecidos (Morris *et al.*, 2002b; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Como a diminuição na produção de leite é verificada após a exposição à esporidesmina e a elevação de GGT só se regista 10 a 15 dias depois, não se pode correlacionar a perda de produtividade inicial com lesões hepáticas, o que sugere a toxicidade da micotoxina na glândula mamária. A diminuição de ingestão de alimento por perda de apetite poderia ajudar a explicar a queda na produção de leite, contudo esta é demasiado rápida e severa para refletir a diminuição de consumo de alimentos. Em animais acometidos ligeiramente a diminuição na produção de leite é transitória, mas em casos de maior gravidade a vaca pode mesmo deixar de produzir leite (Towers & Smith, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Alguns animais podem morrer sem a manifestação de qualquer sinal clínico durante a fase inicial. Ao sexto dia pós início do consumo de esporidesmina, os sinais da fase inicial desaparecem e inicia-se outra fase marcada pela obstrução biliar, entre o décimo e o décimo quarto dia (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

#### 1.1.3.7.2.Fase dermatológica

Esta fase tem início com o despoletar das lesões dermatológicas, uma a duas semanas após o início do consumo de esporidesmina (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Estas localizam-se nas regiões não pigmentadas ou com pouca proteção capilar que estão expostas a radiação solar, como por exemplo: face, lábios, orelhas, vulva, úbere, tetos e zona inguinal. Estas regiões aparecem com edema, tumefação e congestão. Pode desenvolver-se blefarite, tendo a terceira pálpebra tendência para sofrer dermatite solar. A face ventral da língua, em bovinos, pode apresentar ulcerações resultado da exposição solar aquando da limpeza das narinas (Smith & O'Hara, 1978; Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os animais apresentam-se inquietos, em busca constante por sombra (fotofobia), e lambem e coçam as áreas de pele afetadas (Smith & O'Hara, 1978; Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A ordenha ou amamentação da cria pode revelar-se um momento bastante doloroso para as fêmeas com os tetos acometidos (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A existência de lesões na retina e outros tecidos oculares, as quais podem provocar perda de visão, podem ter origem fotossensível, devido à acumulação de fitoporfirina (Scheie *et al.*, 2003). Em casos de FTS aguda e severa, os animais podem sofrer dor intensa, o que os leva à prostração (Smith & O'Hara, 1978; Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A morte de animais num curto período de tempo deve-se na maioria das vezes a complicações devido à FTS e não a insuficiência hepática (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Nos ovinos as lesões dermatológicas, similares às ocorridas em bovinos, localizam-se em áreas glabras (Rodríguez *et al.*, 2010), assim as orelhas são primeiramente atingidas, depois as

pálpebras (epífora) ou as narinas (descarga nasal) e, por fim, toda a face apresenta edema, eritema, exsudação e necrose. A apreensão de alimentos pode ser dolorosa se existirem lesões nos lábios. Alguns animais podem apresentar queratite com edema e opacidade da córnea. Quando são tosquiados os animais ficam mais suscetíveis ao desenvolvimento de pitomicototoxicose, pois a área exposta às radiações solares é maior (Ozmen *et al.*, 2008).

Alguns animais podem apresentar tremores musculares, hemoglobinúria e diarreia nesta fase (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

#### 1.1.3.7.3.Evolução

As lesões dermatológicas, como dermatite e irritação, progridem para descamação, necrose e alopecia, culminando com o destacamento de placas de tecido necrosado e subsequente aparecimento de tecido de granulação subjacente, especialmente, em animais da raça Holstein – Frísia (Smith & O'Hara, 1978; Faull, 1991; Dairy Australia FE Working Group, 2013). As soluções de continuidade, hemorragias e infeções (libertação de exsudados sanguinolentos e com pus) são muitas vezes resultado de manobras de alívio, instigadas pelo prurido, levadas a cabo pelos animais. A perda de viabilidade de áreas extensas de pele deve-se à necrose dos tecidos inflamados e infetados (Smith & O'Hara, 1978; Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A cicatrização da pele é muito lenta, para o que contribui a permanência do prurido durante um longo período de tempo. Alguns animais nos locais das lesões cutâneas desenvolvem hiperqueratose (HPQ), caracterizando-se este tecido pela existência de espículas, pela sua desidratação e dureza (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

Os animais podem desenvolver encefalopatia hepática, resultado das lesões hepáticas (Smith & O'Hara, 1978; Thompson *et al.*, 1979), assim como poliúria e polaquiúria em consequência de cistite (Rodríguez *et al.*, 2010; Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Sequelas como hemoglobinúria crónica e incontinência urinária podem verificar-se (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

O aparecimento de inflamação no bordo coronário, com crescimento das pinças e desenvolvimento de fissuras horizontais da parede das úngulas causa dor e desconforto a nível podal (Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Quanto maior o período de exposição ou maior a quantidade de esporidesmina ingerida, menor o peso da pele e da carcaça dos animais acometidos (Smith, 2000).

Nos ovinos com lesões hepáticas mas sem alterações da pele há alteração da fertilidade e fecundidade das fêmeas, encurtamento da época de cobrição, diminuição da taxa de fêmeas em ovulação e redução do número de ovulações por fêmea (Towers *et al.*, 1990; Farmer Levies, 2011). Num estudo levado a cabo por McMillan *et. al.*, 1988, demonstrou-se uma redução de 10 a 25% na taxa de parição dos rebanhos que parem durante a Primavera, sendo os dados das

parições de Outono ainda mais preocupantes, uma vez que aumentam as mortes de mães e crias e diminuiu o peso vivo dos jovens e a produção de lã. Quanto maior a dose de esporidesmina menor a sobrevivência das ovelhas, redução do peso dos borregos ao nascimento e da sua sobrevivência (McMillan *et al.*, 1988). A ingestão de esporidesmina durante a época de cobrição está associada a perdas de ovelhas e borregos após a parição (Southey *et al.*, 1986). Conclui-se que a *performance* reprodutiva das ovelhas e a sua prolificidade, assim como o peso dos borregos ao desmame é afetado pela intoxicação das fêmeas com esporidesmina (Smeaton *et al.*, 1985).

### 1.1.3.8. Diagnóstico

O aparecimento de FTS no final do Verão/início do Outono com condições climáticas especiais, em animais que se alimentam em pastagens contaminadas com *P. chartarum*, sugerem a existência de pitomicotoxicose (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988), a qual se confirma com a reunião dos sinais clínicos -diagnóstico clínico-, análises sanguíneas para obtenção do perfil hepático -diagnóstico laboratorial- e contagem de esporos da pastagem -diagnóstico micológico- (Rodríguez *et al.*, 2010). Em locais onde nem todas as estirpes produzem esporidesmina ou existe a possibilidade da lesão hepática ter outra origem deve confirmar-se laboratorialmente a produção de esporidesmina -diagnóstico toxicológico- e avaliarem-se macroscópica e histopatologicamente os fígados dos animais afetados -diagnóstico *post mortem* (Smith & Towers, 2002).

O escrutínio rigoroso das fontes alimentares dos animais e dos diversos fármacos administrados permitem descartar o consumo de plantas e medicamentos com atividade fotossensível, respetivamente (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

#### 1.1.3.8.1. Avaliação macroscópica *post mortem* do fígado

Uma forma de aferir os danos hepáticos provocados pela esporidesmina é o acesso direto ao fígado, o que proporciona a realização de uma avaliação, permitindo a padronização das lesões mas inevitabilizando a morte do animal (Smith *et al.*, 1977).

Em 1959, Dodd, dividiu em quatro estádios as lesões macroscópicas do fígado em leves, moderadas, severas e crónicas, tendo também em consideração o aparecimento de lesões fotossensíveis na pele. No estádio leve as lesões aparecem no bordo hepático e consistem em áreas bem definidas, em que a coloração é mais pálida do que o fígado normal, apresentando um aspecto rendilhado e mosqueado. Lesões semelhantes podem aparecer em qualquer outro local do fígado. Quando se secciona o fígado, verifica-se a extensão das lesões no interior do órgão, estando os ductos biliares das zonas afetadas com edema e espessamento da parede. Alguns ductos biliares de calibre médio, circundados por parênquima hepático normal também apresentam lesões de espessamento e edema da parede. Os animais não desenvolvem

fotossensibilidade. No estadió moderado as lesões são do mesmo grau que no estadió leve, apresentado-se, contudo, numa área maior do fígado. Tal como no estadió anterior não há desenvolvimento de fotossensibilidade. No estadió severo a coloração hepática varia entre amarelo esverdeado e verde, notando-se em qualquer superfície de corte a aparência mosqueada e o espessamento dos ductos biliares e do seu conteúdo biliar. O fígado apresenta-se hipertrofiado, com os bordos espessados e arredondados. As lesões são mais evidentes no lobo esquerdo. A vesícula biliar está distendida devido à acumulação de bÍlis. Os ductos biliares extra hepáticos estão espessados e obstruídos. A fotossensibilidade está presente em alguns dos animais que apresentam lesões deste nível. No estadió crónico observa-se a cessação de processos ativos. O aspeto pode variar consoante o local, a extensão das lesões e o grau de oclusão dos ductos biliares. Na face diafragmática do fígado, a superfície branca e densa é composta por tecido com fibrose pronunciada, apresentando a face visceral um ou vários nódulos de tecido hepático regenerativo. Apesar de animais com este grau de lesão hepática poderem apresentar FTS, muitos são aqueles que dermatologicamente não manifestam lesões (Dodd, 1959). No mesmo ano, McFarlane *et al.*, dividiram as lesões hepáticas em cinco estádios. No estadió 1 (normal) não há lesões visíveis, no estadió 2 (focal) 5% do parênquima hepático apresenta lesões focais, no estadió 3 (suave) as lesões afetam 25% do parênquima hepático, no estadió 4 (moderado) 50% do fígado tem lesões e no estadió 5 (severo) mais de 75% do parênquima está afetado (McFarlane *et al.*, 1959).

Em 1977, Smith *et al.*, recategorizaram as lesões hepáticas macroscópicas, numa escala de seis estádios, definindo apenas três, sendo os restantes graus intermédios. Assim, um fígado de estadió zero (0) não apresenta qualquer lesão, o estadió três (3) corresponde a um fígado com 40 a 60% de fibrose do seu volume e com espessamento moderado dos ductos biliares e no estadió cinco (5) o fígado apresenta fibrose generalizada severa que atinge todos os lobos, descoloração do tecido hepático devido aos pigmentos biliares e espessamento acentuado de todos os ductos biliares maiores.

Uma vez que nem todos os animais com pitomicototoxicose apresentam FTS, a visualização de lesões hepáticas pode corroborar no diagnóstico de animais cuja perda de apetite ou quebra de produção de leite não é seguida de FTS (Bonnetfoi & Sauvagnac, 1988).

#### 1.1.3.8.2. Enzimas hepáticas

A enzima do soro capaz de indicar, de forma clara, o grau de lesão hepatobiliar provocado pela esporidesmina tem que apresentar algumas características: ser proporcional ao grau e específica de lesão das vias biliares, estar ausente ou em quantidades mínimas no sangue num animal saudável, aumentar após ação lesiva nas vias biliares, permanecer elevada enquanto existirem lesões nos tecidos sem que se verifiquem picos de atividade, ser de fácil mensuração e

permanecer estável durante a preparação, armazenamento e método de análise. Como a GGT<sup>7</sup> tem atividade aumentada, o que se reflete na sua presença no soro, na presença de lesões do sistema de ductos hepatobiliares, torna-se a enzima do soro mais indicada para mensurar os danos provocados pela esporidesmina no órgão onde a sua ação se faz sentir de forma mais acentuada. Contudo, é necessário ter em conta que o aumento de GGT não é específico da intoxicação por esporidesmina, devendo descartar-se outras causas que provoquem o aumento desta enzima, como por exemplo fasciolose (Towers & Stratton, 1978).

Ainda que a GGT seja produzida por vários tecidos além do fígado, esta é a melhor enzima mensurável no sangue para indicar danos biliares, que neste caso são resultado da ação de radicais livres no epitélio biliar (Munday, 1982; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A GGT aumenta a sua atividade em casos de colestase e, também, quando há danos hepatocelulares que de forma inerente levam a colestase secundária. Quando há danos nos ductos biliares a enzima é libertada em maiores quantidades na corrente sanguínea. A intoxicação por esporidesmina provoca um aumento de GGT que, duas a três semanas após a exposição, é proporcional à lesão hepatobiliar causada (Towers *et al.*, 1990; Flaoyen & Smith, 1992; Dairy Australia FE Working Group, 2013) (Tabela 8), apesar disso é complicado correlacionar os valores de GGT e os danos orgânicos presentes, uma vez que não se sabe o período de exposição à esporidesmina num surto de origem natural (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os valores de GGT mantêm-se elevados vários meses após o estímulo lesivo inicial, podendo encontrar-se valores mais elevados do que o valor fisiológico até sete ou 12 meses, em bovinos e ovinos, respetivamente (Smith & O'Hara, 1978; Towers & Stratton, 1978). Após algumas semanas o valor da enzima hepática decresce mas não recupera os valores fisiológicos imediatamente, mantendo-se elevada, normalmente entre três a seis meses (Towers & Stratton, 1978; Riet- Correa *et al.*, 2013). O valor fisiológico de GGT em bovinos varia entre 0 e 36 UI/L (Collett, 2014).

Animais fotossensíveis apresentam valores mais elevados de GGT, logo maiores danos hepatobiliares (Flaoyen & Smith, 1992). O aumento de GGT em circulação, duas a três semanas após a administração de esporidesmina além de se correlacionar positivamente com o grau de lesão hepática, também tem correlação com a perda de peso evidenciada pelos ovinos intoxicados. Quanto maior a extensão das lesões hepáticas menor o ganho de peso (Towers & Stratton, 1978). Nos bovinos esta correlação não se verifica, pois fatores como a taxa de encabeçamento da pastagem, tipo de solo e manejo da exploração parecem sobrepor-se ao efeito das lesões hepatobiliares (Towers, 1978).

---

<sup>7</sup> A enzima GGT está relacionada com o retículo endoplasmático liso de todas as células, exceto das musculares. A sua atividade é maior na superfície canalicular dos hepatócitos, no epitélio biliar, pâncreas, glândula mamária e rins. Como a pancreatite é rara em bovinos e a excreção de GGT se faz no leite e na urina no caso de lesões mamárias e renais, respetivamente, o seu aumento no soro deve-se essencialmente às lesões hepáticas e biliares (Seixas, 2009; Davoudi, 2013).

**Tabela 8: Correlação entre os níveis de GGT, o grau de lesão hepática e quebra de produção leiteira em bovinos (adaptado de Faull, 1991 e Parkinson *et al.*, 2010 referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013)**

Nível de GGT	Intervalos de GGT (UI/L)		Grau de Lesão hepática		Descrição	Diminuição da produção leiteira (Kg/vaca)
	Parkinson <i>et al.</i> , 2010, referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013	Faull, 1991	Parkinson <i>et al.</i> , 2010, referido por Dairy Australia FE Working Group, 2013	Faull, 1991		
1	30-70	0-59	Sem lesão	0	Sem lesão hepática.	0
2	70-300	60-199	Leve	1-2	Lesão leve a moderada do fígado, especialmente dos ductos biliares.	0,67
3	300-700	200 – 699	Moderada	3-4	Lesão moderada a grave do fígado, com fibrose em cerca de 40 a 60 % da sua área. Espessamento dos ductos biliares.	5,28
4	>700		Grave	5	Lesão severa do fígado. Espessamento acentuado de todos os grandes ductos biliares. Fibrose severa de todos os lobos hepáticos. Descoloração dos tecidos devido à pigmentação biliar.	17,29

A mensuração de GGT permite diagnosticar animais com pitomicotoxicose que não apresentam lesões fotossensíveis, uma vez que revela a existência de lesões hepatobiliares quando não existem sinais exteriores de doença (Towers & Stratton, 1978). Com a descoberta da correlação positiva (0,65 – 0,81) entre o aumento dos valores de GGT no soro, duas a três semanas após a administração da esporidesmina, e a existência de lesões hepatobiliares provocadas pela micotoxina, foi possível uma deteção mais precoce, rápida, barata, simples e menos invasiva, não havendo necessidade de abater o animal (Smith & O'Hara, 1978; Towers & Stratton, 1978; Flayoen *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 2002b).

Uma segunda enzima hepática, glutamato desidrogenase (GDH)<sup>8</sup>, parece ser útil, pois o seu aumento tem uma correlação de 0,83±0,01 com o aumento de GGT, o qual aumenta para 0,93±0,03 se se tiver em conta a correlação genética atual entre ln (GGT) e ln (GDH). O aumento desta enzima ocorre em resposta a danos hepatocitários, ao contrário da GGT que aumenta nos casos de dano biliar, além disso apresenta um tempo de vida no sangue menor do que a GGT. Em animais com pitomicotoxicose esta pode atingir valores de 2 000 UI/L (valores fisiológicos entre 8 – 41 UI/L) (Phua *et al.*, 2008; Cullen *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2013; Collett, 2014). O

<sup>8</sup> A enzima GDH é específica do fígado em bovinos (Davoudi, 2013).

aumento desta enzima mostra que a patogenia da pitomicotoxicose não se centra unicamente no sistema biliar mas, também, no parênquima hepático (Flaoyen & Smith, 1992).

Nos ovinos afetados pela pitomicotoxicose, na fase inicial em que se regista insuficiência hepática primária e citólise, há aumento de aspartato aminotransferase (AST), GGT, FAS, bilirrubina do soro e ornitina carbamiltransferase e uma diminuição na albuminemia (Mortimer, 1962; Rodríguez *et al.*, 2010). Na segunda fase, após um curto período de funcionamento, a circulação biliar é interrompida, registando-se aumento do colesterol, fosfolípidos, bilirrubina sérica, ácidos biliares,  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas e FAS, podendo manter-se elevados por um período mínimo de 40 dias (Mortimer & Taylor, 1962 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). Um estudo em ovinos demonstrou que animais fotossensíveis apresentam reservas menores de glicogénio hepático, valores maiores de GGT, GDH, bilirrubina total, conjugada e não conjugada do que animais que também ingeriram esporidesmina e não apresentam FTS (Flaoyen & Smith, 1992).

A mensuração do tempo de eliminação da bromosulfaleína não é um método de diagnóstico de pitomicotoxicose sensível o suficiente para diagnosticar a existência de lesões hepáticas provocadas pela intoxicação por esporidesmina, pois animais com elevado grau de dano hepático não revelaram aumento de tempo do teste (Towers & Smith, 1978).

#### 1.1.3.9. Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial de pitomicotoxicose centra-se principalmente na distinção de outras intoxicações ou doenças que também manifestam FTS, quer esta seja primária<sup>9</sup>, por defeitos no metabolismo de pigmentos<sup>10</sup> ou secundária ou hepatógena<sup>2</sup>.

Na primeira abordagem a um caso suspeito de FTS é fulcral que se faça diferenciação com outras doenças dermatológicas. A presença de lesões em áreas glabras ou com pouco pelo e hipopigmentadas, a ação do animal aquando da sua permanência em locais expostos ao sol e a sua constante procura pela sombra são suficientes para identificar um caso de FTS. Posteriormente, é importante determinar o tipo de FTS. É preciso enfatizar que a consideração

---

<sup>9</sup> Na FTS primária, o agente fotodinâmico, quer seja ingerido, absorvido através da pele ou injetado, entra na circulação sistémica e chega à pele, onde atua. O agente fotodinâmico pode exibir a sua ação por contacto direto externo na pele. Nalguns casos o agente fotodinâmico entra no organismo sob a forma de um precursor, o qual sofre uma alteração tornando-se ativo (Smith & O'Hara, 1978; Seixas, 2009).

<sup>10</sup> A Porfíria Eritropoiética Bovina ou Porfíria Congénita é uma patologia hereditária que se deve a um defeito enzimático no processo metabólico de síntese do grupo heme, em que se formam isómeros de porfirina de série I (uro e coproporfirina), estes acumulam-se no organismo e funcionam como agentes fotodinâmicos. No processo fisiológico de formação do grupo heme os isómeros de porfirina pertencem à série III (uroporfirinogénio III cosintetase) (Glenn *et al.*, 1964; Smith & O'Hara, 1978). A manifestação deste tipo de fotossensibilidade verifica-se em animais com idades precoces. Além das lesões fotossensíveis, os animais apresentam ossos castanhos e dentes rosados que se tornam vermelho alaranjados quando incididos com luz UV (Smith & O'Hara, 1978).

dos locais e períodos críticos para o desenvolvimento de FTS, a presença de fatores predisponentes, tal como muitas vezes a impossibilidade de separação entre a fonte alimentícia e a origem da substância tóxica são fulcrais na abordagem de um surto de FTS (Smith & O'Hara, 1978).

Agentes fotodinâmicos presentes em áreas dermatológicas expostas a luz solar absorvem, em comprimentos de onda característicos, baixa energia, sendo transportados para níveis energéticos mais elevados. Os agentes fotodinâmicos excitados, isto é, em níveis energéticos superiores, na presença de oxigênio, iniciam uma série de reações que culminam na produção de radicais livres, os quais danificam a estrutura dos lípidos insaturados das membranas celulares, especialmente dos lisossomas onde os agentes fotodinâmicos se encontram mais concentrados. A rotura da parede dos lisossomas permite a libertação de mediadores químicos da inflamação e de enzimas hidrolíticas que alteram a permeabilidade vascular, contribuindo para o aparecimento de FTS (Smith & O'Hara, 1978). A eficiência dos agentes fotodinâmicos depende das suas propriedades fotoquímicas e da capacidade de serem absorvidos pelas células, a qual varia com a estrutura molecular do agente fotodinâmico e com o lapso temporal entre a ingestão, absorção ou administração do agente e a sua chegada às células. O caráter lipofílico dos agentes fotodinâmicos é determinante na sua taxa de absorção celular. Agentes fotodinâmicos lipofílicos acumulam-se maioritariamente em estruturas membranares como as mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana nuclear e citoplasmática, enquanto os agentes hidrofílicos preferem os lisossomas. A localização dos agentes nos lisossomas parece estar associada a uma menor fototoxicidade. No caso da fitoporfirina esta acumula-se, principalmente, na mitocôndria e aparelho de Golgi. A acumulação de agentes fotodinâmicos nas mitocôndrias, neste caso a fitoporfirina, parece relacionar-se com uma maior gravidade da FTS apresentada pelos animais (Scheie *et al.*, 2002)

O agente fotodinâmico com maior relevância nos bovinos é a fitoporfirina, uma porfirina que resulta do metabolismo da clorofila. Na impossibilidade de ser excretada devido à existência de lesões hepatobiliares, mantém-se na circulação sanguínea onde pode apresentar toxicidade (Smith & O'Hara, 1978).

Na identificação de FTS primária devem procurar-se sinais da existência de agentes fotodinâmicos no meio ambiente por onde os animais passaram na última semana antes do início dos sinais clínicos. A avaliação do conteúdo do rúmen pode ser útil na pesquisa de plantas tóxicas consumidas (Smith & O'Hara, 1978). Na Tabela 9 estão descritos alguns dos agentes fotodinâmicos mais comuns relacionados com FTS primária.

Tabela 9: Agentes fotodinâmicos responsáveis por fotossensibilidade primária em ruminantes

Planta	Agente Fotodinâmico	Nome (s) comum (ns) / Outros	Bibliografia
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hipericina	Erva-de-são-joão ou hipericão	(Glenn <i>et al.</i> , 1964) (Smith & O'Hara, 1978) (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	Fagopirina	Trigo sarraceno ou trigo mourisco	(Glenn <i>et al.</i> , 1964). (Smith & O'Hara, 1978).
<i>Ammi majus</i> L.	Furocumarinas	Âmio-maior ou âmio-vulgar	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010) (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Heracleum sphondylium</i>	Furocumarina	Canabrás ou esfondílio	(Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ruta montana</i> (1) <i>Ruta graveolens</i> L. (2)	Furocumarina	(1) arruda, arrudão ou rudão; (2) arruda-comum, arruda-das-boticas, arruda-dos-jardins, erva-das-bruxas	(Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Chenopodium album</i>	Furocumarina	Catassol, ansarina-branca, erva-couvinha, pedagoso, sincho ou quenopódio-branco	(Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Brassica</i> spp.	Glicosinolatos Aminoácido S-metilcisteína sulfóxido	Couve, couve-nabiça, colza, nabo	(Seixas, 2009) (Collett, 2014) (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
Químicos	Indicação Terapêutica	Outros	Bibliografia
Rosa Bengala	Corante	-	(Seixas, 2009)
Corantes de acridina	Corante	-	(Seixas, 2009)
Corticosteróides	Ação anti-inflamatória, imunossupressora	Corticosteróides de longa ação para indução de parto podem desencadear fotossensibilidade nos tetos	(Seixas <i>et al.</i> , 2007) (Seixas, 2009) (Dairy Australia FE Working Group, 2013)
Tetraciclina	Antibioterapia	-	(Seixas <i>et al.</i> , 2007) (Seixas, 2009)
Sulfonamidas	Antibioterapia	-	(Seixas <i>et al.</i> , 2007) (Seixas, 2009)
Tiazidas	Diurético	-	(Seixas, 2009)
Fenotiazina - Sulfóxido de Fenotiazina (conversão no intestino)	Anti - helmíntico	-	(Glenn <i>et al.</i> , 1964). (Smith & O'Hara, 1978) (Seixas, 2009)
Deltametrina	Inseticida	-	(Pinto <i>et al.</i> , 2005).

A correlação entre a existência de disfunção hepatobiliar e FTS foi demonstrada pela primeira vez por Quin, 1933 (Quin, 1933 referido por Glenn *et al.*, 1965). A confirmação do envolvimento hepático pode ser feita pela avaliação da coloração das mucosas, as quais se apresentam ictéricas em caso de lesão hepática, pelas análises sanguíneas indicadoras do perfil hepático ou pela avaliação macroscópica e histopatológica do fígado. A coloração do soro sanguíneo não é

fiável uma vez que pode apresentar coloração amarelada pela presença de carotenoides (Smith & O'Hara, 1978). A mensuração de fitoporfirina no plasma através de espectrofluorometria pode ser útil no diagnóstico de FTS hepatógena devido a acumulação de fitoporfirina (Scheie *et al.*, 2003).

A pesquisa de hepatotoxinas causadoras de lesões no fígado deve realizar-se durante a primeira semana de apresentação dos sinais clínicos, através da análise do soro sanguíneo ou tecidos do animal, contudo o resultado nem sempre confirma o diagnóstico presuntivo (Smith & O'Hara, 1978). As hepatotoxinas, desencadeantes de lesões hepáticas nos ruminantes, têm origem, normalmente em plantas (Tabela 10), fungos e/ou nas suas micotoxinas (Tabela 11) ou algas (cianobactérias), mas também em bactérias (Tabela 10) (Scheie *et al.*, 2002). Algas da espécie *Microcystis aeruginosa*, produtoras da toxina microcistina, podem provocar lesões hepáticas que levem a fotossensibilidade, assim como o parasitismo por *Fasciola hepatica* (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Tabela 10: Plantas e bactérias implicadas na FTS secundária

Planta	Princípio Tóxico	Tipo de Lesão	Nome Comum	Bibliografia
<i>Senecio jacobea</i> <i>Senecio vulgaris</i>	Alcalóides: retrorsina, senecifilina, monocrotalina	Primária do parênquima hepático	Erva-de-são-tiago, tasna, cardo-morto, tasneirinha	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010) (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Echium plantagineum</i> (1) <i>Echium vulgare</i> (2)	(1)Alcalóides: equiumina e equiumidina (2)Alcalóides de pirrolizidina	Primária do parênquima hepático	Soagem-viperina, soagem, chupa-mel, língua-de-vaca Soagem, viperina	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010) (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lantana camara</i>	Ácidos triterpenos pentacíclicos (Lantadina, lantadeno A e B)	Primária do parênquima hepático	Lantana, cambará	(Seixas, 2009) (Dairy Australia FE Working Group, 2013). (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Tribulus terrestris</i>	Sapogeninas esteróides: diosgenina e iamogenina	Lesão mista dos ductos biliares e parênquima hepático	Abrolhos, abrolhos-terrestres, abroma	(Glenn <i>et al.</i> , 1965). (Smith & Towers, 2002). (Seixas, 2009) (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Nartheicum ossifragum</i>	Saponinas		Não definido	(Glenn <i>et al.</i> , 1965). (Seixas, 2009)
<i>Brachiaria spp.</i>	Saponinas e sapogeninas			(Smith & Towers, 2002). (Riet-Correa <i>et al.</i> , 2013).
<i>Panicum miliaceum</i>	Saponinas esteróides e sapogeninas	Lesão primária dos ductos biliares	Nome comum: painço	(Smith & Towers, 2002). (Dairy Australia FE Working Group, 2013).
<i>Trifolium spp.</i>	Isoflavona	Não definido	Trevo	(Smith & O'Hara, 1978). (Quintas <i>et al.</i> , 2014)
<i>Borago officinalis</i>	Alznsalóides de pirrolidizina	Não definido	Borragem, borago	(Quintas <i>et al.</i> , 2014)

Bactérias	Tipo de Lesão	Bibliografia
<i>Leptospira interrogans</i>	Lesão primária do parênquima hepático	(Smith & O'Hara, 1978). (Pinto <i>et al.</i> , 2005).
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Abcesso hepático	(Tadepalli <i>et al.</i> , 2009)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Abcesso hepático	(Tadepalli <i>et al.</i> , 2009)

**Tabela 11: Fungos e suas micotoxinas implicados na FTS secundária**

Fungo	Hepatotoxina	Tipo de lesão	Bibliografia
<i>Phomopsis leptostromiformis</i> (Lupinose)	Phomopsin A e B	Lesão primária do parênquima hepático	(Seixas, 2009)
<i>Aspergillus sp.</i>	Aflatoxina		(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010)

### 1.1.3.10. Lesões anatomopatológicas

#### 1.1.3.10.1. Lesões macroscópicas

Em intoxicações agudas, o fígado apresenta-se hipertrofiado e com coloração amarelada, lobulação evidente e consistência mais firme, podendo os ductos extra hepáticos apresentar-se com espessamento da parede e a vesícula biliar com tamanho normal ou aumentado [devido à obstrução do canal colédoco, do ducto cístico ou à inibição das contrações para expulsão da bÍlis, podendo os sais biliares estar implicados na última hipótese (Flaoyen & Smith, 1992)] e com edema da parede (Dodd, 1959; Done *et al.*, 1960 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Crawley *et al.*, 1961; Ozmen *et al.*, 2008; Riet-Correa *et al.*, 2013; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Em casos crónicos, o fígado tem coloração amarelada ou esbranquiçada, a qual se deve à proliferação de tecido fibroso nas áreas periportais. O lobo hepático esquerdo é o mais afetado pela fibrose e pela atrofia, apresentando-se os restantes também atingidos (Dodd, 1959; Done *et al.*, 1960 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Crawley *et al.*, 1961; Riet-Correa *et al.*, 2013; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Quando o lobo direito tem um tamanho maior do que o lobo esquerdo, o qual se apresenta firme, pálido, pequeno e adelgado (Crawley *et al.*, 1961; Riet-Correa *et al.*, 2013; Dairy Australia FE Working Group, 2013), a possibilidade de tal animal ter sido alvo de toxicidade crónica por esporidesmina é muito elevada (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os ductos biliares intra-hepáticos podem apresentar-se espessados, com estenose do lúmen. Por vezes, podem encontrar-se detritos celulares no lúmen dos ductos biliares (Smith & Embling, 1991). A distrofia apresentada pelo fígado resulta, em grande parte, da fibrose hepática e edema das vias biliares (Glenn *et al.*, 1965). Em animais com lesões mais antigas, o fígado desenvolve nódulos de regeneração, visíveis através de alterações da sua morfologia (Clare, 1952; Done *et al.*, 1960).

Os linfonodos hepáticos aparecem, normalmente, edemaciados e hipertrofiados (Mortimer & Taylor 1962 referido por Smith, 2000).

Um estudo em ovinos, mostrou que os animais com FTS, comparativamente aos não fotossensíveis após a ingestão de esporidiesmina, apresentavam maior espessamento dos ductos biliares, maior dureza e consistência hepáticas, palidez mais acentuada do fígado e maior hipertrofia da vesícula biliar (Flaoyen & Smith, 1992).

Na bexiga podem observar-se, por vezes, hemorragias, edema e ulceração da mucosa, mais raramente, focos de inflamação e necrose (Done *et al.*, 1960; Smith & Embling, 1991; Smith & Towers, 2002) e hipertrofia renal (Smith & Embling, 1991). Atrofia do timo e hipertrofia das glândulas adrenais podem ocorrer (Smith, 2000).

#### 1.1.3.10.2. Lesões microscópicas

Nos cortes histológicos de fígado observa-se pericolangiohepatite e colangite obstrutiva aguda (pode dever-se à acumulação de tecido necrótico e biliar, pode estar presente material cristalóide – micrólitos), desaparecimento e necrose do epitélio dos ductos, hiperplasia marcada dos ductos biliares inter e intralobulares e fibrose progressiva dos espaços porta, que afeta tanto os vasos sanguíneos como os maiores ductos biliares (pericolangiofibrose). Também no espaço porta a visualização de eosinófilos e a formação de tecido de granulação é frequente (Evans *et al.*, 1957 referido por Worker, 1960; Dodd, 1959; Crawley *et al.*, 1961; Mortimer & Taylor, 1962 referido por Smith, 2000; Greenwood & Williamson, 1985; Kellerman & Coetzer, 1985 referido por Pinto *et al.*, 2005; Flaoyen *et al.*, 1991; Flaoyen & Smith, 1992; Ozmen *et al.*, 2008; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Por vezes, pode observar-se estase biliar nos hepatócitos, células de Kupffer ou nos sinusóides (Done *et al.*, 1960; Smith & Embling, 1991).

As lesões do parênquima hepático são menos exuberantes do que nos ductos biliares, apresentando-se sob a forma de pequenos focos de necrose nos hepatócitos centrolobulares [nos hepatócitos periportais segundo Smith & Towers, 2002], por enfartes canaliculares (Dodd, 1959; Glenn *et al.*, 1965; Flaoyen *et al.*, 1991; Ozmen *et al.*, 2008), perda de arquitetura e de limites celulares e sinusoidais (Flaoyen & Smith, 1992) e vacuolização hidrópica dos hepatócitos, que na área periportal parece ser constante (Crawley *et al.*, 1961; Flaoyen *et al.*, 1991; Flaoyen & Smith, 1992). Podem estar presentes microabcessos (Flaoyen & Smith, 1992; Smith & Towers, 2002). A reação inflamatória, que pode observar-se dispersa pelo fígado, é maioritariamente de origem neutrofílica (Flaoyen & Smith, 1992). As alterações presentes a nível ultra estrutural nos hepatócitos são: vacuolização, depleção de glicogénio, acumulação de triglicéridos, proliferação do retículo endoplasmático liso, dilatação canalicular e desorganização das microvilosidades canaliculares (Jordan, 1986). Com o tempo o fígado pode apresentar cirrose, atrofia progressiva dos hepatócitos, proliferação intensa de tecido conjuntivo (Smith & Embling, 1991; Hansen *et al.*, 1994 referido por Collin *et al.*, 1998a) e, por vezes, hiperplasia regenerativa (Ozmen *et al.*, 2008).

Deposição de tecido fibroso nas ramificações da veia porta e artéria hepática, presentes na proximidade de ductos biliares lesionados, levam a obstrução dos vasos em questão (Done *et*

*al.*, 1960 referido por Glenn *et al.*, 1965). Nas lesões vasculares observa-se espessamento, degenerescência e distorção da íntima e espessamento da média (Glenn *et al.*, 1965; Smith & Embling, 1991), o que pode levar a obstrução do lúmen dos vasos (Hansen *et al.*, 1994 referido por Collin *et al.*, 1998a). Nos ovinos verifica-se a presença de enfarte hepático devido à trombose dos vasos hepáticos (Mortimer, 1963 referido por Hohenboken *et al.*, 2000). Em ovinos, caprinos e alguns bovinos, pode verificar-se o aparecimento de uma lesão patognomónica na qual, num caso extremo, há oclusão vascular, nas arteríolas hepáticas e veias do espaço porta, devido à proliferação fibroblástica subintimal excêntrica, do lado adjacente ao ducto afetado (Done *et al.*, 1960 e Mortimer, 1963 referidos por Collett, 2014; Smith & Embling, 1991).

Se a esporidesmina em circulação tiver uma concentração suficientemente alta, ao ser excretada parcialmente na urina pode provocar edema e petéquias na submucosa da bexiga (Crawley *et al.*, 1961) ou até necrose (Smith & Towers, 2002). Em ovinos pode aparecer vascularização subepitelial e infiltração por neutrófilos (Smith, 2000). No rim de ovinos pode encontrar-se degenerescência epitelial ou necrose dos tubulos coletores renais (Mortimer, 1963 referido por Hohenboken *et al.*, 2000). A necrose tubular aguda e a basofilia tubular são indicativas da lesão tóxica (Hohenboken *et al.*, 2000).

A zona reticulata do córtex das glândulas adrenais parece sofrer degenerescência, enquanto as zonas fasciculata e glomerulosa estão hiperplásicas. A medula pode apresentar infiltração eosinofílica (Crawley *et al.*, 1961).

A variação, de animal para animal, na presença e intensidade da icterícia, na presença de lesões das glândulas adrenais e da bexiga, do volume da vesícula biliar, da coloração, do tamanho e da consistência do fígado dificultam a estimativa da duração da intoxicação, mesmo com observação microscópica das lesões (Done *et al.*, 1960 referido Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

#### 1.1.3.11. Tratamento

Todos os animais pertencentes a um rebanho afetado, quer apresentem ou não lesões dermatológicas, devem ser removidos imediatamente da pastagem contaminada ou suspensa a disponibilidade de fardos de feno ou silagem contaminados. A providência de dieta equilibrada, abundante e facilmente digestível, com pouca proteína e sem clorofila, ajuda na regeneração hepática, a qual pode ser melhorada com administração de coleréticos, protetores hepáticos à base de metionina ou suplementos ricos em vitaminas do grupo B, especialmente vitamina B12 (Smith & O'Hara, 1978; Bonnefoi & Sauvagnac, 1988; Ozmen *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Farmer Levies, 2011).

O tratamento recomendado nos casos em que os animais apresentam FTS é paliativo e sintomático, devendo os animais ficar resguardados da luz solar durante o dia e libertos para a pastagem durante a noite (Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A

utilização, nas lesões dermatológicas, de protetores solares é co adjuvante na recuperação (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Em animais com lesões de pele persistentes e com prurido, o uso de corticosteroides é preferencial ao uso de anti histamínicos (Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A existência de infecções secundárias nas lesões fotossensíveis pode determinar o uso de antibiótico (Ozmen *et al.*, 2008). O aparecimento de miasas em animais com lesões dermatológicas é mais provável do que em animais com a pele intacta (Farmer Levies, 2011).

Em casos graves pode ser necessário secar as vacas lactantes (Dairy Australia FE Working Group, 2013), ainda que alguns autores recomendem que esta medida seja tomada de imediato em todas as vacas leiteiras acometidas (Smith & O'Hara, 1978). A secagem dos animais além de permitir a redução do metabolismo hepático, que beneficiará a sua recuperação, também diminui a probabilidade do animal contrair mastites, patologia frequentemente identificada como sequela da FTS (Smith & O'Hara, 1978; Bonnefoi & Sauvagnac, 1988).

O uso de pedilúvios com sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) no tratamento de animais com FTS podal ajuda a que as lesões se mantenham livres de infecção e acelera a sua cicatrização (Rodríguez *et al.*, 2010).

#### 1.1.3.12. Prognóstico

A capacidade exímia de regeneração do fígado explica a sobrevivência de alguns animais (Towers & Stratton, 1978), sendo que os bovinos são, consideravelmente, mais bem-sucedidos do que os ovinos no que respeita à regeneração hepática (Dairy Australia FE Working Group, 2013). A regeneração pode iniciar-se duas semanas após a intoxicação, havendo sinais macroscópicos de recuperação entre as seis e as oito semanas (Smith & Towers, 2002).

Animais intoxicados por esporidesmina estão mais propensos a problemas na Primavera seguinte à intoxicação, tanto com causas metabólicas como com FTS, uma vez que, o fígado recupera a capacidade para lidar com necessidades básicas mas, perante, por exemplo, o crescimento do feto no último trimestre ou a absorção acrescida de fitoporfirina essa eficiência hepática é exígua (Smith & O'Hara, 1978; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Alguns dos animais produtores de leite que recuperam, morrem no periparto, pois a capacidade de metabolismo hepático está diminuída, e é neste período que esta é mais essencial (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Verifica-se, também, a morte de alguns animais numa fase tardia, devido a mastite (Towers, 1978). A mortalidade na generalidade não é muito elevada se os animais forem estabilados e tratados devidamente (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A mensuração de GGT como forma de apoio a um prognóstico é desaconselhada, uma vez que a sua longa meia vida e fraca correlação com o estado geral do animal não perspetivam a realidade sobre o animal em causa (Towers, 1978).

#### 1.1.3.13. Controlo e prevenção

Desde a identificação da relação de *P. chartarum* com a pitomicototoxicose (eczema facial) que vários foram os esforços para encontrar medidas de controlo do fungo e prevenção da patologia, tendo como objetivo a diminuição de animais acometidos pela doença (Phua *et al.*, 2008). A evolução dos métodos de controlo e prevenção de pitomicototoxicose é coincidente com a evolução científica e tecnológica, almejando a descoberta de técnicas simples, práticas e funcionais, mas, também, efetivas e com o maior prolongamento de ação possível no tempo. Podem considerar-se três grandes domínios no combate à pitomicototoxicose: minimizar a ingestão da micotoxina esporidesmina (aplicação de fungicidas na pastagem, controlo biológico por competição das estirpes residentes tóxicas de *P. chartarum* com estirpes introduzidas não tóxicas, cultivo de pastagens com plantas desadequadas ao crescimento do fungo saprófita, manejo das pastagens tendo em consideração a contagem de esporos de *P. chartarum*), proteger os animais da ação da esporidesmina (suplementação, imunização contra a esporidesmina, administração de antioxidantes e administração de quantidades profiláticas de zinco) e desenvolver animais mais resistentes à micotoxina (cruzamento de animais comprovadamente menos suscetíveis e investigação genética para descoberta dos genes envolvidos na resistência à doença) (Campbell *et al.*, 1981; Morris *et al.*, 1994; Smith & Towers, 2002; Phua *et al.*, 2008).

Os métodos de prevenção e controlo de pitomicototoxicose devem ser iniciados quando a contagem de esporos da pastagem se prepara para ultrapassar os 20000 esporos/g de erva e as condições meteorológicas são compatíveis com a esporulação do fungo (Dairy Australia FE Working Group, 2013). O uso combinado de dois ou três métodos de proteção assegura uma maior probabilidade de manter os animais sãos (Farmer Levies, 2011).

##### 1.1.3.13.1. Fungicidas

O primeiro fungicida utilizado no controlo de pitomicototoxicose, através da diminuição do número de esporos na pastagem, foi o tiabendazol em 1967. Em 1971 demonstrou-se que, também o benomil e o tiofanato-metilo tinham ação sobre o fungo. Wallace (1976) comparou a ação fungicida de carbendazim, tiofanato-metilo e benomil, concluindo que o carbendazim reduzia com maior eficácia o número de esporos na pastagem (Sinclair & Parle, 1967 e Parle & di Menna, 1968 referidos por Wallace, 1976; Sinclair & Howe, 1968; Wallace, 1976). A taxa de aplicação de tiabendazol deve rondar os 150 a 560 g/ha, já a de carbendazim deve ser de 140 a 280 g/ha (Athernthon *et al.*, 1974 referido por Bonnefoi & Sauvagnac, 1988). A aplicação aérea de tiabendazol mostrou a mesma eficiência que a aplicação manual (Parle *et al.*, 1972).

O uso de fungicida é efetivo quando a pastagem está verde, em crescimento, pois este atua sistemicamente e, quando existem menos de 20000 esporos/g de erva. Em pastagens com mais de 200000 esporos/g de erva o resultado da ação fungicida é ineficaz. O fungicida não elimina os esporos já existentes, a sua ação centra-se na interferência na germinação de esporos ativos (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Se nos três dias após a aplicação do fungicida ocorrer a precipitação de 25 mm de água, num período de 24 horas, deve proceder-se a uma nova aplicação. Os animais não devem ser introduzidos nos cinco dias subsequentes ao tratamento, o qual apresenta uma eficácia de seis semanas, contudo, a partir da quarta semana recomenda-se a contagem de esporos para verificar o estado da pastagem (Parle *et al.*, 1972; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

O uso de fungicida diminui os esporos da pastagem em cerca de 55 a 60% (Farmer Levies, 2011; Taranaki Veterinary Centre, 2015). A combinação de aplicação de fungicida nas pastagens com o manejo e contagem de esporos das mesmas potencia o alcance da proteção dos animais (Smith & O'Hara, 1978).

Actualmente, na Nova Zelândia, o uso simultâneo de fungicida carbendazim com surfactante à base de organosilicone, permite que o primeiro seja rapidamente absorvido na base da planta, melhorando o método (Dairy Australia FE Working Group, 2013; Donaghys, 2013).

#### 1.1.3.13.2. Controlo biológico por competição com estirpes não tóxicas

Estudos, em laboratório, sobre o efeito positivo da exclusão biocompetitiva por estirpes que não são tóxicas de *P. chartarum* sobre as estirpes tóxicas mostraram uma redução na produção de esporidesmina entre 50 a 100% quando a inoculação era composta por estirpes sem toxicidade e tóxicas em comparação com a inoculação exclusiva de estirpes tóxicas (Collin & Towers, 1995b). Aquando da testagem do método numa estufa, os resultados foram semelhantes aos conseguidos em laboratório (Fitzgerald *et al.*, 1995 referido por Fitzgerald, *et al.*, 1998). Num estudo realizado em pastagens reais, a redução de esporidesmina chegou aos 80% nas parcelas onde se inocularam estirpes sem toxicidade em comparação com parcelas onde apenas se encontravam estirpes naturalmente presentes, ainda que nestas o número de esporos não tenha atingido níveis elevados. Noventa por cento dos esporos encontrados na pastagem às quatro semanas após a inoculação eram não tóxicos, passando a 54% às 19 semanas e após 15 meses estes esporos significavam apenas 4% de um total de 145 isolados da pastagem. Este decréscimo indica ou uma menor resistência na pastagem das estirpes que não são tóxicas ou a propagação rápida das tóxicas de parcelas contíguas. A inoculação das pastagens com estirpes que não são tóxicas de *P. chartarum* deve ser realizada no início do Verão, antes que as estirpes residentes, que são produtoras de esporidesmina se multipliquem, assim é mais fácil colonizar a matéria vegetal morta de modo a impedir a progressão das estirpes tóxicas (Fitzgerald *et al.*, 1998).

#### 1.1.3.13.3.Espécies de plantas forrageiras alternativas

Existem plantas cuja introdução na pastagem previne o aparecimento de pitomicotoxicose, uma vez que há menor tendência para deposição de matéria vegetal morta junto ao solo. Tais plantas pertencem aos seguintes géneros ou espécies: *Trifolium repens* - trevo branco, *Trifolium pratense* - trevo dos prados, *Pennisetum* spp. - capim, *Paspalum* spp. - grama de ponta, *Lotus* spp. - loto, *Festuca arundinacea* - erva carneira - e *Cichorium intybus* - chicória. Também legumes como *Medicago* spp. - luzerna -, *Hedysarum* spp. - sanfeno - e *Onobrychis* spp. - esparzeta - ajudam na diminuição da presença de matéria vegetal morta (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Quando a pastagem é composta, na totalidade ou em grande maioria, por plantas que contribuem para a acumulação de matéria vegetal morta junto ao solo, pode semear-se, nessa mesma pastagem, na Primavera, uma espécie como *Trifolium pratense* - trevo dos prados, com floração tardia, que predominará na pastagem durante o Verão e Outono (Farmer Levies, 2011).

#### 1.1.3.13.4.Maneio de pastagens

A intervenção direta na redução da toxicidade das pastagens pode ser conseguida através de alterações na dinâmica agrícola e na forma de pastoreio. Assim se se prolongar a sobrevivência das gramíneas (uso de estirpes menos susceptíveis a altas temperaturas e baixa humidade, irrigação dos solos, proporcionar enraizamento mais profundo), se se controlarem as doenças e pragas das pastagens (por exemplo, *Puccinia coronata* fungo responsável pela ferrugem da folha do *Lolium perenne* – azevém perene), se se mensurar a altura pré e pós pastoreio das plantas, se se reduzir a floração das gramíneas (maneio do pastoreio e uso de gramíneas com floração menos exuberante), se se reduzir o pisoteio animal, se se evitar a morte de folhas devido à sombra (maneio do pastoreio) consegue-se reduzir a quantidade de matéria vegetal morta junto ao solo, reduzindo-se a existência de um fator vital na esporulação do fungo, o substrato. O corte da pastagem pode não ser benéfico se já existir matéria vegetal morta que contribua para o desenvolvimento e esporulação do fungo (Brook, 1963; Brook & Mutch, 1964; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A suplementação de forragem, silagem e concentrado/grão (Dairy Australia FE Working Group, 2013) e pastagens onde predominam espécies de baixo risco devem ser reservadas para períodos de elevado risco de pitomicotoxicose (Rodríguez *et al.*, 2010; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A manutenção da pastagem ligeiramente alta na qual se procede a um pastoreio de baixa intensidade, uma hora de pastoreio matinal e outra hora ao final na tarde, por exemplo, evita o consumo de plantas junto do solo, logo menor ingestão de esporos (Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). O enfardamento ou ensilagem de erva proveniente de locais de risco deve ser precedido de contagem de esporos para avaliar a toxicidade da cultura

(Rodríguez *et al.*, 2010). Nas pastagens tóxicas, a prática de pastoreio diminui a toxicidade das mesmas aquando e após o pastoreio, o que se pensa estar correlacionado com a maior exposição da base da vegetação à luminosidade e à precipitação, contudo há baixa correlação entre a precipitação e a diminuição de toxicidade dos esporos (Collin *et al.*, 1995).

No Verão as pastagens em que existe uma consociação de gramíneas e leguminosas, tornam-se, maioritariamente, predominadas por gramíneas devido ao consumo principal das leguminosas, as quais não voltam a crescer devido à falta de humidade do solo. Estas pastagens apresentam pequenas áreas onde os animais urinam, e onde, posteriormente, preferem ingerir alimento, contudo é aqui, também, que se encontra a maior quantidade de esporos de *P. chartarum* por grama de erva, pois a erva degradada pela urina (substrato), a maior quantidade de azoto presente (nutrição) e a existência de um ambiente mais protegido (ambiente) proporcionam condições favoráveis à esporulação, assim é necessário impedir o pastoreio exaustivo destas áreas, por exemplo, através de rotação de pastagens ou controlando o nível de intensidade do pastoreio (Keogh, 1973; Farmer Levies, 2011).

#### 1.1.3.13.5. Suplementação

A suplementação com milho, silagem e grão/concentrado, permite um menor consumo de pastagem, ficando diminuída a ingestão de esporos (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Um estudo com ratos, em 1969, mostrou que animais sujeitos a dietas mais ricas em proteína eram mais resistentes aos efeitos da esporidesmina. A caseína foi identificada como a proteína responsável pela melhor adaptação a doses crescentes da micotoxina, tendo a fração fosfospeptona da caseína o mesmo efeito nos animais que a caseína quando administrada na totalidade (Hove & Wright, 1969).

#### 1.1.3.13.6. Imunização contra a esporidesmina

Devido ao baixo peso molecular da esporidesmina esta necessita estar ligada a uma proteína para desenvolver uma resposta imune (Smith & Towers, 2002). Este método de prevenção não surtiu efeito e, atualmente, não está disponível (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

#### 1.1.3.13.7. Profilaxia com antioxidantes

A administração de antioxidantes como o hidroxitulueno butilato (BHT) e o hidroxianisol butilato (BHA) reduziram as lesões hepáticas provocadas pela esporidesmina em 39% e 35%, respetivamente. A administração contemporânea de BHT e zinco (Zn) melhora a proteção conferida aos animais, em relação ao uso individual de cada um (Munday *et al.*, 1983).

#### 1.1.3.13.8. Profilaxia com zinco

A investigação sobre o Zn, em Ruakura Animal Research Station, iniciou-se devido à ideia defendida por um produtor, na década de 70. Este alegava que havia uma deficiência generalizada de Zn<sup>11</sup> na Nova Zelândia o que interferia em muitas reações metabólicas. O grupo de investigação veio a concluir que a administração de Zn, a bovinos e ovinos, de 25 (20 a 30) vezes a dose diária recomendada tinha um efeito protetor em relação à pitomicotoxicose, tanto em intoxicações agudas como crónicas (Smith *et al.*, 1977; Towers & Smith, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Devido à dose protetora ser muito maior do que a dose habitual de suplementação, a administração de Zn não é apenas uma questão nutricional, mas do foro farmacológico (Dawson & Laven, 2007). Apesar dos riscos de toxicidade que a administração de Zn apresenta, os benefícios resultantes, são considerados por alguns, mais relevantes (Smith & Embling, 1999). A prevenção com Zn não só diminui as lesões hepáticas como as lesões do aparelho urinário, evidenciado o carácter inespecífico de proteção do Zn em relação ao órgão afetado (Smith *et al.*, 1977). A fórmula química do composto que contém o Zn e seu modo de administração influenciam a proteção conferida (Smith, 1977).

O modo de ação preciso do Zn na proteção contra a pitomicotoxicose ainda não está claramente esclarecido, nem o porquê da necessidade de doses tão superiores à suplementação normal, contudo algumas hipóteses são propostas (Bennison *et al.*, 2010a). O Zn forma, com os grupos sulfidrilo da esporidesmina reduzida, um complexo mercaptido estável que impede a ocorrência de lesões celulares ao inibir a auto oxidação de esporidesmina ditiol (forma reduzida da esporidesmina) e subsequente formação de radicais livres. Inibe, também, a absorção de cobre a nível intestinal, o qual é catalisador na formação dos radicais livres de oxigénio. Na prevenção com óxido de zinco, parte do Zn parece não agir antagonicamente à absorção e metabolismo do cobre, uma vez que se encontra ligado à esporidesmina para a reduzir (Munday, 1985; Dawson & Laven, 2007; DeFrain *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Outro possível modo de ação é a ligação do Zn com a esporidesmina ou com a sua forma reduzida ainda no tracto gastrointestinal, sendo que, *in vitro*, existe a evidência da formação de um complexo aniónico estável entre a esporidesmina e o Zn na presença de um agente redutor (Woodcock *et al.*, 2001a). Um estudo, *in vitro*, realizado com células HepG2, mostrou que apenas uma pequena quantidade de Zn é necessária no interior das células de forma a conferir proteção contra a esporidesmina, podendo esta, talvez, advir da formação de um composto tetraédrico entre o Zn e a esporidesmina, impedindo a micotoxina de interagir com macromoléculas celulares ou de originar espécies reativas de oxigénio. Outra forma de atuação do Zn pode ser a sua capacidade de inibição de diversos passos da apoptose, impedindo as células lesadas pela esporidesmina

---

<sup>11</sup> <sup>11</sup> O Zn é o oligoelemento mais abundante a nível celular, é componente estrutural ou co fator de mais de 300 metaloenzimas e desempenha um papel de modulador da expressão génica na ativação de fatores de transcrição como MTF1 (Duncan *et al.*, 2005).

de concluir este ciclo de morte programada (Bonnetoi & Sauvagnac, 1988; Waring *et al.*, 1990; Duncan *et al.*, 2005). Um estudo recente afirma que uma quantidade mínima de Zn no tracto gastrointestinal é necessária para conferir proteção, uma vez que a concentração de Zn nas fezes está relacionada com a atividade da GGT, já a concentração de Zn no soro parece não corresponder da mesma forma. Este é um fator importante e que pode estar relacionado com as elevadas doses de Zn necessárias para a proteção contra a pitomicototoxicose (Bennison *et al.*, 2010a).

As concentrações de Zn no soro de um bovino necessárias para conferirem proteção são de 20 – 35  $\mu\text{mol/L}$ , o que corresponde a uma dose diária de 20 mg/Kg pv (entre 15 e 30 mg/Kg pv) (Munday *et al.*, 2001; Smith & Towers, 2002; Dairy Australia FE Working Group, 2013), idêntica à dose necessária nos ovinos (Smith *et al.*, 1977; Towers & Smith, 1978; Towers & Smith, 1984 referido por Munday *et al.*, 2001).

Os animais necessitam que a administração de Zn, sob qualquer forma (com água, com alimento, por *drench* oral ou bolo intra ruminal), se inicie antes do período crítico cerca de duas a três semanas (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013; Taranaki Veterinary Centre, 2015), contrariamente ao proposto inicialmente, em que a administração de Zn, contemporânea da intoxicação por esporidemia, parecia ser a melhor opção (Towers, 1977).

A administração de Zn na água faz-se sob a forma de sulfato ( $\text{ZnSO}_4$ ), ao invés do óxido ( $\text{ZnO}$ ) que é a forma usada nas restantes vias de administração, uma vez que o óxido tem uma margem de segurança mais confiável do que o sulfato (Dairy Australia FE Working Group, 2013; Smith & Embling, 1999). O  $\text{ZnSO}_4$  é 1,6 vezes mais biodisponível do que o  $\text{ZnO}$ . Quer o sulfato quer o óxido de Zn podem estar contaminados com pequenas quantidades de chumbo e cádmio, dessa forma recomenda-se a análise da matéria prima para que esta não ultrapasse os 200 mg/Kg de chumbo (0,02%) nem os 20 mg/Kg de cádmio (0,002%). Os suplementos de Zn devem ser apropriados para o uso na alimentação animal (DeFrain *et al.*, 2010; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Mais recentemente, descobriu-se que Zn elementar também é efetivo na prevenção do aumento de atividade da GGT em ovinos e bovinos jovens que pastoreiam locais com contagens de esporos elevadas (Bennison *et al.*, 2010 a; Bennison *et al.*, 2010b).

A duração da suplementação parece ser segura até 100 dias, sendo a partir deste período sugerida a realização de análises sanguíneas para mensuração dos níveis de Zn no soro (DeFrain *et al.*, 2010; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A incorporação de sulfato de Zn na água para abeberamento dos animais é um método pouco efetivo e exato de providenciar proteção em momentos muito críticos, uma vez que a quantidade de água ingerida por cada animal depende de diversos fatores que impossibilitam o controlo minucioso da quantidade de  $\text{ZnSO}_4$  administrada (concentração de  $\text{ZnSO}_4$  nos bebedouros,

condições atmosféricas - temperatura e humidade-, existência de outros locais de abeberamento - poças de água, ribeiros-, variação individual de ingestão de água, produção de leite, peso vivo, percentagem de matéria seca dos alimentos ingeridos) (Smith *et al.*, 1983). Existem duas formas de sulfato de Zn, o monohidratado que apresenta dificuldade de dissolução uma vez que é um pó bastante fino, e o heptahidratado que apesar de ser de fácil dissolução levanta problemas de armazenamento. O uso de um mecanismo capaz de introduzir o ZnSO<sub>4</sub> no sistema de água é indicado, pois a introdução direta do metal nos bebedouros é desaconselhada. Como a água com ZnSO<sub>4</sub> tem um sabor estranho, a introdução deve ser gradual ( $\frac{1}{4}$  da dose no primeiro dia, atingindo a dose em três a cinco dias), não devendo haver outro local de acesso a água normal, pois os animais evitarão a água suplementada. A adição de aromatizantes doces à água suplementada pode ajudar a uma melhor aceitação por parte dos animais. Este método de proteção pode ser implementado em épocas de baixo risco mas não em períodos em que se requer proteção eficiente. Este tipo de prevenção, se for utilizada por longos períodos, pode ter um sucesso entre 80 a 90% (Dawson & Laven, 2007). A prevenção com ZnSO<sub>4</sub> em bovinos leiteiros, permite a manutenção do pv e da produção leiteira e a redução de lesões hepáticas, observável pela mensuração da GGT no soro e pela avaliação das lesões hepáticas *post mortem* (Towers & Smith, 1978). Este método não é utilizado em ovinos, pois o consumo diário de um animal não permite a ingestão da quantidade de Zn necessária para conferir proteção (DeFrain *et al.*, 2010; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A administração oral de soluções contendo ZnSO<sub>4</sub>, através de *drench* pode despoletar o reflexo da goteira esofágica em ovinos, deixando a mucosa abomasal suscetível à ação lesiva da solução (Smith, 1977).

Na utilização de *drench* oral para administração, devem dissolver-se 10 Kg de ZnO em 25 L de água, se se dispuser de estabilizadores de Zn-Cu (cobre) ou fertilizantes à base de algas (por exemplo Maxicrop®) a proporção a utilizar é 10 Kg de ZnO em 10 L de água com 2 L de estabilizador. O estabilizador além de permitir a concentração do *drench* pela diminuição da quantidade de água, também ajuda na dissolução e administração do mesmo. A determinação de cada dose individualmente é muito demorada, sendo assim, o agrupamento de animais por classes facilita a determinação da dose a administrar. Ao utilizar *drench* sem estabilizador a dose diária é 7 mL/Kg pv numa situação de prevenção antecipada, se for numa ocasião crítica a administração diária deve ser de 10 mL/Kg pv. Se o *drench* tiver um estabilizador incorporado, como a solução se encontra mais concentrada, a dose diária é de 3,6 mL/Kg pv para proteção atempada ou 5 mL/Kg pv diariamente em caso de urgência (Taranaki Veterinary Centre, 2015). Para diminuir o número de administrações, deve utilizar-se a dose de 10 ml da substância, sem estabilizador, ou 5 mL da substância, com estabilizador, por cada 100 Kg pv do animal vezes o número de dias de intervalo entre cada *drench*, contudo quanto menor o número de aplicações menor a proteção conferida. Uma administração diária tem uma eficácia de 80 a 90%, se a aplicação for semanal a proteção conferida é de cerca de 60%, enquanto numa proteção bimensal este valor passará para 50%. Esta forma de administração é indicada em vacas secas

e animais jovens quando o risco de pitomicotoxicose é elevado e não houve prevenção adequada antecipadamente, contudo a proteção adquirida nesta forma é menos eficaz do que outras formas de administração de Zn (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013; Taranaki Veterinary Centre, 2015). Como a prevenção com Zn se deve basear na suplementação diária, este é um método pouco prático em rebanhos grandes e em que os animais não permitam um manejo próximo (Munday *et al.*, 1997 referido por Munday *et al.*, 2001).

A suplementação com ZnO, do concentrado, grão ou melaço, providenciados aquando da ordenha nos animais leiteiros, é um método eficaz (70 a 80% de redução no número de animais afetados) (Taranaki Veterinary Centre, 2015), no entanto, é necessário assegurar a correta mensuração da dose a administrar, a qual se deve aproximar de 20 mg de ZnO/Kg pv ao dia (Towers & Smith, 1978; DeFrain *et al.*, 2010). Um aumento na dose de cada animal pode levar a intoxicação enquanto uma diminuição inviabiliza a proteção necessária. Para garantir a constância e fidedignidade do valor, todos os intervenientes, desde a fábrica de rações, ao Médico Veterinário assistente e ao produtor, devem utilizar o método HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), para validar as suas ações e impedir erros. Os pontos críticos a ter em atenção são a incorporação do ZnO no concentrado, grão ou melaço, a mensuração dos pesos de cada animal ou de um grupo de animais, a disponibilidade, aquando da ordenha, da quantidade correta de alimento suplementado e a verificação da agregação do ZnO com o alimento que serve de veículo. Sempre que se desejar fazer alterações na quantidade de concentrado, grão ou melaço a dose de ZnO deve ser ajustada (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Outra forma de administração de ZnO são os bólus intra ruminais de libertação controlada, este é um método bastante eficiente de proteção contra a pitomicotoxicose. Os bólus têm forma cilíndrica, sendo o núcleo composto por ZnO, um agente de ligação e outro de libertação, cobertos por uma camada protetora impermeável à água, excepto na extremidade plana onde se verifica o desgaste do dispositivo. A outra extremidade é hemisférica e coberta pela camada impermeável. Vários dispositivos disponíveis na Nova Zelândia apresentam uma libertação de ZnO de 4,25 g/dia em animais jovens com pesos entre 175 e 250 Kg, esta é determinada pelo diâmetro do dispositivo e pela composição do núcleo. (Munday *et al.*, 1997 referido por Munday *et al.*, 2001; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A permanência do bólus no organismo dos bovinos é de cerca de quatro semanas, contudo a proteção conferida é de cinco semanas, uma vez que os níveis residuais de Zn ainda são profiláticos. Entre a quinta e a sexta semana, as concentrações de Zn no soro são mais elevadas do que em animais não protegidos mas já não são suficientes para proteger, assim pode ser necessária a aplicação de outro bólus nesse momento (Munday *et al.*, 2001). Os bólus intraruminais podem, além do Zn, possuir selénio e cobalto, proporcionando suplementação adicional nestes elementos (Grace *et al.*, 1997). A recente descoberta da proteção conferida pelo Zn elementar e das suas vantagens

como menor toxicidade em doses elevadas, densidade superior dos bólus evitando a regurgitação, assim como maior integridade e dureza dos bólus, fez com que se desenvolvesse um bólus de Zn elementar, ainda que a eficácia seja ligeiramente menor do que os bólus de ZnO (Bennison *et al.*, 2010a).

A aplicação de ZnO na pastagem é um método pouco laborioso que permite proteger um elevado número de animais. A área de pastagem a tratar deve ser pequena, a erva deve estar longa e o pastoreio deve ser permitido até que a maioria do alimento seja consumido (pastoreio que dure entre 12 a 24 horas). Este método não deve ser utilizado em bezerros, apenas animais adultos e jovens adultos (Farmer Levies, 2011).

Aconselha-se o uso de bólus nos períodos de maior risco de pitomicotoxicose, preferindo-se a suplementação na água ou alimento em momentos menos críticos. O Zn faz parte de um plano profilático, assim não apresenta nenhum factor que propicie o tratamento, logo não tem qualquer efeito quando administrado após a ingestão de esporidesmina nem quando os animais já evidenciam sinais clínicos. O seu papel nas lesões hepáticas reflete-se na proteção futura e não na reversão de danos já existentes (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A minuciosidade na dose de Zn não se deve só à preocupação no conferimento de proteção mas, também porque a dose efetiva é próxima da dose tóxica. A toxicidade do Zn é dose dependente. Os animais começam por apresentar queda na produção de leite, pelagem em mau estado, perda de apetite e conseqüente perda de peso. Os sinais clínicos variam desde gastroenterite aguda a anoréxia, podendo ocorrer algumas mortes. Vários órgãos são afetados pelo excesso de Zn no organismo, sendo o pâncreas encontrado quase sempre com lesões atróficas e fibróticas. Contudo, são as alterações abomasais (ulceração) e renais, a par das hemolíticas, as que mais contribuem para a degradação do estado de saúde dos animais afetados. O diagnóstico de intoxicação por Zn pode fazer-se através da avaliação no soro dos níveis do elemento em questão ou da amilase, que se encontrará baixa devido à perda de tecido pancreático (Smith *et al.*, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Aquando do uso de bólus de Zn elementar, a mensuração de Zn nas fezes é melhor indicador de eficácia do que o Zn no soro (Bennison *et al.*, 2010a).

Quando a função hepática se encontra alterada há diminuição da produção de metalotioneína e albumina, uma proteína que intervém na desintoxicação de iões metálicos e uma proteína transportadora de Zn no soro, respetivamente. A perda de função hepática implica desequilíbrio no metabolismo do Zn o que pode beneficiar a aparição de toxicidade deste metal nos animais afetados. A administração de Zn, posterior à ingestão de esporidesmina, além de não conferir proteção nem tratamento, também propicia à existência de intoxicação por Zn, devido às lesões hepáticas que já possam existir, assim o limiar de toxicidade do metal é mais baixo quando existem lesões e se procede à suplementação. A toxicidade do Zn, manifestada pelas lesões

pancreáticas, também pode ter origem na maior absorção intestinal do metal, que é possível devido ao desequilíbrio gastrointestinal provocado pela esporidesmina (Smith & Embling, 1999). A salmonelose pode aumentar a sua incidência em animais suplementados com ZnO (Rammel, 1991).

Outra questão relacionada com a suplementação de Zn, em todos os grupos de animais, é a consequente hipocuprémia e diminuição dos níveis hepáticos de cobre e selênio, assim, recomenda-se a sua suplementação após a suplementação com Zn, excepto em situações de deficiência em que a suplementação dos vários elementos pode ser contemporânea (Towers *et al.*, 1981; Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Parece que o mecanismo protetor do Zn, no caso da pitomicototoxicose, se relaciona em parte com a menor disponibilidade do cobre (Cousins, 1985, referido por Munday *et al.*, 2001; Munday & Manns, 1989; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A suplementação com cobre simultânea ou anterior à suplementação com Zn pode interferir no mecanismo de proteção do Zn, sendo recomendável a avaliação da ingestão de cobre antes do início da suplementação com Zn (Farmer Levies, 2011; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Um estudo em bovinos leiteiros sobre o impacto da suplementação de Zn no equilíbrio do cobre, revelou o baixo impacto do Zn nas concentrações hepáticas de cobre quando este é consumido em doses baixas, já quando se procede à suplementação contemporânea de Zn e Cu, esta fica diminuída em cerca de 50% no que diz respeito ao cobre (Smith *et al.*, 2010). Quando a esporidesmina chega a um fígado já lesado pelo excesso de cobre, o seu efeito tóxico é potenciado. A suplementação contemporânea de Zn e Cu, leva a que o metabolismo do Cu seja alterado, pois em vez deste elemento atingir concentrações elevadas no plasma, fica armazenado na mucosa intestinal onde pode estimular a oxidação da esporidesmina sem que esta tenha a oportunidade de se ligar ao Zn (Dawson & Laven, 2007). Assim, é aconselhável uma paragem na suplementação do cobre quando se procede à suplementação com Zn (Smith 2010).

O metabolismo do cálcio também é alterado pela suplementação com Zn (Taranaki Veterinary Centre, 2015). Um estudo com vacas em lactação mostrou uma diminuição acentuada do cálcio no soro 12 a 24 horas após a suplementação com ZnO (120 mg ZnO/Kg pv), esbatendo-se a queda do mineral em circulação em administrações subsequentes de ZnO devido à ativação dos mecanismos homeostáticos do cálcio. Nas vacas secas a diminuição do cálcio em circulação é menos acentuada, sendo também os mecanismos de compensação menos evidentes (Thilising-Hansen & Jorgensen, 2001). A relação antagónica entre o cálcio e o Zn expõe os animais suplementados em excesso ao risco de hipocalcémia, ainda que a situação possa ser revertida pelos mecanismos de regulação do mineral (Smith *et al.*, 1984 referido por Thilising-Hansen & Jorgensen, 2001).

A avaliação dos níveis de Zn no soro deve ser feita três a quatro semanas após o início da suplementação, devendo recolher-se sangue de dez animais (cinco dos animais mais pequenos

da exploração e cindo do animais maiores), esta avaliação deve ser repetida se o teste indicar problemas com a suplementação ou quando os animais estão suplementados há mais de 100 dias (Munday, 1984a; Munday, 1985; Henderson *et al.*, 1995; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A suplementação de Zn em níveis elevados nos animais de produção pode contribuir para o aumento de Zn no leite e nas vísceras para consumo humano, devendo ter-se em conta os limites máximos permitidos por lei para a presença deste metal, de modo a não comprometer o estado de saúde dos consumidores (Smith *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1983).

#### 1.1.3.13.9. Seleção genética

A seleção genética em bovinos de leite, quer seja referente ao carácter leiteiro quer seja em relação à seleção para a resistência a patologias, deve obedecer a princípios éticos, tendo em conta a sustentabilidade, ecologia e biologia de todos os intervenientes (animais, plantas, ecossistemas e humanos responsáveis pelas ações desencadeantes). A seleção de características específicas nos animais deve ter em conta os objetivos principais da política agrícola internacionalmente acordada, na qual deve haver espaço para a opinião de cada parte interessada (produtores, veterinários, defensores do bem estar animal, consumidores e público em geral), constando esta na tomada de decisões. Na prática, a instrução, conhecimento, capacidade, experiência e valores dos intervenientes são princípios basilares na manutenção do equilíbrio das expectativas geradas pela capacidade de intervir nas características das novas gerações de animais, como no bem estar dos indivíduos intervencionados. A manipulação genética deve ser vigiada cuidadosamente para impedir ou minimizar quaisquer aspetos negativos que afetem os animais envolvidos e num sentido mais amplo a viabilidade biológica e ecológica das alterações infligidas. A reflexão quanto ao rumo e objetivos da seleção genética animal deve ser constante, analisando a compatibilidade das necessidades e exigências futuras dos humanos com as expectativas dos animais, ou melhor dizendo, com as expectativas que a sociedade apresenta para os animais (Fisher & Mellor, 2008).

Devido ao grave problema que a pitomicotoxicose representa na Nova Zelândia, investigadores locais tentaram desde sempre, encontrar medidas eficazes para o controlo da doença. A par dos avanços tecnológicos e do conhecimento científico, a seleção genética surge como ferramenta útil no controlo de doenças em que a heritabilidade é conhecida, como é o caso desta doença (Phua *et al.*, 2008). Assim, o cruzamento com vista à tolerância avista-se como uma resolução a longo termo. Nos dias de hoje, na Nova Zelândia, estão disponíveis machos tolerantes para cruzamento comercial e estuda-se a possibilidade de utilizar o ácido desoxirribonucleico (ADN) desses machos para criar um teste marcador de ADN (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

A resistência individual à pitomicotoxicose num conjunto de animais sob as mesmas condições pode justificar-se considerando a distância ao solo a que pastoreia cada animal, ao metabolismo

ruminal diferenciado tendo em conta a composição relativa da microbiota indígena do rúmen, as diferenças no grau de absorção intestinal e no metabolismo e excreção da esporidesmina, a tolerância dos tecidos à micotoxina e a capacidade de reparação tecidual (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Mesmo quando se introduzem machos tolerantes num rebanho ou se inicia um programa de seleção genética com vista à resistência, os métodos de prevenção anteriormente implementados devem continuar a ser utilizados por algumas gerações até que o rebanho apresente um grau de resistência homogêneo (Dairy Australia FE Working Group, 2013).

#### 1.1.3.13.9.1 Genética quantitativa

Atualmente, a seleção genética utilizada como forma para conferir maior resistência à pitomicototoxicose é do tipo truncada, em que a seleção de animais resistentes se faz com base na resposta à administração de esporidesmina natural ou intencional (Dairy Australia FE Working Group, 2013) num teste de *performance* ou de descendência (mensuração de GGT antes de administração de esporidesmina, repetindo-se a mensuração 21 dias após a administração de esporidesmina. Os animais cujo valor de GGT aumentar mais de 30% são considerados suscetíveis, os que não atingirem este valor são sujeitos a um novo teste com uma dose maior de esporidesmina) (Towers *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1981; Morris *et al.*, 1994). O estudo da variação dos valores de GGT permitiu correlacionar o grau de lesão hepática *post mortem* com os valores de GGT duas a três semanas após a ingestão de esporidesmina (Towers & Stratton, 1978), tendo sido o valor ln (GGT) usado para estudar a heritabilidade da resistência à pitomicototoxicose (Morris *et al.*, 2004).

Como os ovinos de raça Romney são os mais abundantes na Nova Zelândia, havendo, assim, maior variabilidade genética, Campbell *et al.* em 1975 utilizaram a avaliação *post mortem* dos fígados dos descendentes dos animais em estudo, aos quais foi administrada esporidesmina, para determinar a heritabilidade da resistência à pitomicototoxicose, concluindo que esta variava entre 0,4 e 0,6 (Campbell *et al.*, 1975 referido em Phua *et al.*, 2008). Entretanto, definiram-se as linhas orientadoras da seleção de machos, utilizando-se para tal, os níveis de lesão hepática resultantes da administração de esporidesmina na descendência dos carneiros em questão (teste de descendência) e em 1981 o mesmo autor atualizou o valor da heritabilidade para  $0,42 \pm 0,09$ . Com os animais avaliados criaram-se dois rebanhos de ovinos, um rebanho com animais mais resistentes e um rebanho com animais mais suscetíveis (Campbell *et al.*, 1981), tendo passado o método de escolha dos machos a ser feito com base num teste de *performance*<sup>12</sup>, com posterior quantificação dos níveis de GGT no soro (Towers *et al.*, 1983). Em

---

<sup>12</sup> A substituição de um teste de descendência por um teste de *performance*, uma vez que a correlação entre o valor ln (GGT) de um jovem macho num teste de *performance* tem uma correlação positiva com os resultados da sua descendência mais tarde enquanto reprodutor, evidencia a existência de heritabilidade diferente de zero e a contribuição genética para a característica (Morris *et al.*, 2013).

1982, criaram-se mais dois rebanhos com origem num mesmo grupo de animais, um rebanho controlo e um rebanho para submeter a teste de *performance*, tendo este último sido incorporado ao grupo resistente em 1988. A existência de um grupo controlo permite a comparação entre o grupo resistente e o grupo suscetível (Morris *et al.*, 1989). Desde 1987, adotou-se o uso de Valores Genéticos Estimados (BLUP)<sup>13</sup>, neste caso ln (GGT) [avaliação do valor ln (GGT) de todos os parentes do candidato em questão], através da análise de máxima verosimilhança restrita para delinear a seleção dos carneiros. Em 1988, a diferença entre a linha resistente e a linha suscetível era de ln 2,9, em 1991 era de ln de 3,7 e em 1995 era de ln 6,9. A resposta à seleção é mais elevada na linha resistente, uma vez que a baixa pressão de seleção aplicada e a baixa heritabilidade diminuíram as taxas reprodutivas havendo menor número de machos para cruzar na linha suscetível. As ovelhas, devido à toxicidade da esporidesmina na *performance* reprodutiva das fêmeas, não eram incluídas nos testes de seleção para resistência (Morris *et al.*, 1995; Phua *et al.*, 1999). A análise dos rebanhos, suscetível e resistente, até 1993, mostra que o rebanho resistente consegue avançar na resistência 1,77 vezes mais rápido do que o rebanho suscetível na suscetibilidade, sendo a diferença entre os dois rebanhos de  $1,82 \pm 0,05$  unidades ln (GGT). O progresso genético do rebanho resistente é de  $- 0,08 \pm 0,02$  unidades ln (GGT) ao ano, tendo o rebanho suscetível um valor de  $0,04 \pm 0,02$  ln (GGT) unidades ao ano (Morris *et al.*, 1995). Em 1995, Morris *et al.* estimaram que a heritabilidade de ln (GGT), com base na mensuração da enzima três semanas após a administração de esporidesmina, de todos os anos, de todos os rebanhos e de todas as taxas de esporidesmina estudadas até então é de  $0,45 \pm 0,05$ .

A heritabilidade da resistência à pitomicototoxicose nos bovinos leiteiros de raça Jersey,  $0,31 \pm 0,10$ , foi indicada pela primeira vez em 1990 resultando do estudo de um surto de ocorrência natural (Morris *et al.*, 1990), tendo sido, posteriormente, realizado um estudo de descendência dos touros em questão que confirmou o valor indicado (Morris *et al.*, 1991a). A continuação, a longo prazo, do estudo iniciado por Morris *et al.*, em 1990, atualizou o valor da heritabilidade daqueles animais de  $0,31 \pm 0,10$  para  $0,32 \pm 0,10$  (Morris *et al.*, 2002a). Em 1998, a heritabilidade estimada para a raça Frísia foi determinada,  $0,29 \pm 0,15$  segundo uma análise univariada e  $0,46 \pm 0,27$  segundo uma análise multivariada, e atualizado o valor da raça Jersey,  $0,77 \pm 0,13$  (Morris *et al.*, 1998). O estudo de todos os dados relativos à raça Jersey permitiu estimar um valor de heritabilidade combinada de  $0,48 \pm 0,10$ . A variação dos valores da heritabilidade para a raça Jersey pode dever-se a uma maior segregação de genes em alguns animais (Morris *et al.*, 2002a). Mais recentemente, estimou-se a heritabilidade geral dos animais produtores de leite em  $0,34 \pm 0,02$  e  $0,30 \pm 0,04$ , tendo em conta ln (GGT) e ln (GDH), respetivamente (Cullen *et al.*, 2011).

---

<sup>13</sup> O valor genético estimado de um animal refere-se ao valor desse animal como reprodutor, podendo definir-se como a sua superioridade ou inferioridade genética para o carácter em estudo, do qual só metade será transmitida à descendência. O valor genético estimado reveste-se de importância num padrão de comparação e não no sentido do valor absoluto que representa (Carolino *et al.*, 2009).

Os progressos genéticos não se devem ao abate de animais doentes mas sim à seleção genética que beneficia o cruzamento de animais resistentes (Morris *et al.*, 1991b). Após 25 anos de seleção genética, objetivando um aumento de resistência face à pitomicotoxicose, a linha de ovinos resistentes, em Ruakura Research Centre, difere da linha suscetível num fator de suscetibilidade onze vezes menor (Morris *et al.*, 2004). Já no Auckland Romney Development Group o cruzamento sucessivo durante 29 anos tem permitido um progresso genético de 2% ao ano (Amyes & Hawkes, 2014). Em rebanhos de bovinos de leite, com programas de seleção, a resistência pode melhorar duas a três vezes em oito ou nove anos de seleção (Farmer Levies, 2011).

#### 1.1.3.13.9.2. Pitomicotoxicose e parâmetros de produtividade

A comparação de parâmetros reprodutivos, em linhas de seleção para resistência à pitomicotoxicose em ovinos Romney, mostrou que machos e fêmeas da linha suscetível são menos férteis e a sua prolificidade é menor do que a linha resistente (Morris *et al.*, 1991c). A fertilidade dos machos varia nas diversas linhas de seleção, na linha resistente apenas 8% das ovelhas mostraram subfertilidade (<60% das ovelhas se reproduziram na presença de carneiros), valor que sobe para 16% na linha controlo e para 37% na linha suscetível (Morris *et al.*, 1999).

A heritabilidade para a resistência a esta doença, em bovinos de leite, é comparável e por vezes superior à heritabilidade das características do carácter leiteiro (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Na raça Jersey, ln (GGT) está correlacionado negativamente com a gordura (-0,32) e proteína do leite (-0,16) (Morris *et al.*, 1990).

#### 1.1.3.13.9.3. Resistência à pitomicotoxicose e outras a micotoxicoses

A resistência à pitomicotoxicose parece estar correlacionada, em pequena parte, com a resistência à infeção por nemátodes e a outras toxinas, como o lolitreto B e a ergovalina, responsáveis pelas intoxicações nas pastagens de azevém perene, *Lolium perenne* L. infetado pelo endófito *Neotyphodium lolii* (correlação genética entre a suscetibilidade às duas doenças é de 0,31) e de erva carneira, *Festuca arundinacea* infetada pelo endófito *Acremonium coenophialum*, respetivamente. Quanto à resistência à micotoxina zearalenona, produzida por *Fusarium* spp., a seleção parece divergir da seleção para a resistência à esporidesmina pois as enzimas presentes na desintoxicação da esporidesmina convertem a zearalenona em  $\alpha$ -zearalenona, um metabolito com ação mais tóxica, contudo são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese (Hohenboken *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2004).

#### 1.1.3.13.9.4. Estudos de ADN

A seleção genética de características relacionadas com a saúde é muito dispendiosa se se proceder à quantificação fenotípica. Assim a identificação de genes individuais através de

programas de tipificação genética ou a informação resultante de *Quantitative Trait Loci* (QTL)<sup>14</sup> pode permitir reconhecer animais com superioridade para uma certa característica de forma mais eficiente (Harris, 2005).

As linhas de seleção para determinação dos genes e *loci* intervenientes na resistência à pitomicototoxicose, no âmbito dos estudos genéticos, foram utilizadas em diferentes tipos de testes como: determinação da frequência alélica associada a marcadores de ADN para verificação de genes candidatos<sup>15</sup>, comparação dos padrões de expressão génica de tecido proveniente do fígado das duas linhas de seleção usando uma matriz de cADN e experimentação de um teste de QTL pela análise de famílias de meios irmãos com origem em machos, resultado do cruzamento recíproco entre as duas linhas (Tabela 12) (Phua *et al.*, 2014b). Estes testes permitirão a inclusão de seleção dirigida de forma mais eficiente nos esquemas de melhoramento genético (Morris *et al.*, 2004).

Tabela 12 Ensaio com as linhas de seleção da raça ovina Romney, (Phua *et al.*, 2014b)

Ensaio	Genes/Locus	Cromossoma e coordenadas
Genes Candidatos	ABCG2	OAR6: 36.5 Mbp
	Catalase	OAR15: 63.3 Mbp
Ensaio QTL	QTL Sugestivo (log GDH)	OAR1: 28.7 – 197.5 Mbp
	QTL Significativo (log GGT)	OAR3: 14.6 – 96.9 Mbp
	QTL Sugestivo (log GDH)	OAR8: 10.6 – 80.2 Mbp
	QTL Sugestivo (log GDH)	OAR13: 3.8- 79.2 Mbp
	QTL Sugestivo (log GGT)	OAR 23.4 – 73.8 Mbp
Seleção por varredura	Peddrift SNP (P<0,000001)	OAR1: 92.64 Mbp
	Peddrift SNP (P<0,000001)	OAR11: 24.42 Mbp
	Peddrift SNP (P<0,000001)	OAR: 12: 47.35 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000005)	OAR6: 25.23 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000001)	OAR6: 25.25 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000001)	OAR9: 3.32 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000001)	OAR9: 5.85 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000001)	OAR12: 49.87 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000002)	OAR19: 21.84 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000009)	OAR19: 31.99 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000002)	OAR24: 4.12 Mbp
	Peddrift SNP (P=0,000001)	OAR26: 42.35 Mbp
	Smoothed F <sub>ST</sub> peak SNP	OAR1: 76.1 Mbp
	Smoothed F <sub>ST</sub> peak SNP	OAR6: 25.2 Mbp
	Smoothed F <sub>ST</sub> peak SNP	OAR7: 79.3 Mbp
	Smoothed F <sub>ST</sub> peak SNP	OAR13: 17.4 Mbp
Smoothed F <sub>ST</sub> peak SNP	OAR19: 25.1 Mbp	

<sup>14</sup> *Quantitative Trait Loci* são regiões cromossômicas relacionadas com a variação de características quantitativas. Na identificação da localização de um QTL, utilizam-se marcadores moleculares polimórficos, que se pensa estarem suficientemente próximos e ligados ao QTL, para que, na maioria da progénese de um indivíduo heterozigoto, seja possível associar a variação da característica quantitativa em estudo com o genótipo do marcador, que será indicativo do genótipo do QTL (Mota *et al.*, 2000).

<sup>15</sup> Genes candidatos são genes que podem explicar a variação de um fenótipo, tendo em conta a sua função bioquímica ou a relevância da região cromossômica onde se inserem (Morris *et al.*, 2004).

#### 1.1.3.13.9.5. Associações bioquímicas com a resistência à pitomicotoxicose

Em três grupos de animais selecionados para a resistência à pitomicotoxicose e três grupos de animais suscetíveis avaliou-se a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase. A atividade da enzima superóxido dismutase foi sempre superior na linha suscetível, já a catalase e a glutatona peroxidase apresentaram maior atividade na linha resistente (Hohenboken *et al.*, 2004), ainda que um estudo anterior tenha demonstrado que os genes que codificam algumas destas enzimas (superóxido dismutase e glutatona peroxidase), entre outras, cobre-zinco-superóxido dismutase e glutatona redutase não mostram cosegregação significativa com as características da pitomicotoxicose nos *outcross pedigrees* (Phua *et al.*, 1998 referido por Phua *et al.*, 1999).

Um estudo dedicado às membranas eritrocitárias concluiu que a ligação da esporidesmina aos eritrócitos não varia entre a linha resistente e a linha suscetível de ovinos, contudo a densidade, a resistência ao *stress* por calor ou por tratamento com sais biliares dos eritrócitos é maior na linha resistente. Animais não selecionados mas caracterizados tendo em conta os seus eritrócitos, em animais com eritrócitos mais densos e menos densos, tiveram elevações menores e maiores de In (GGT) após a ingestão de esporidesmina, respetivamente (Upetri *et al.*, 1991 referido por Morris *et al.*, 2004).

#### 1.1.3.13.9.6. Biologia molecular

A transferrina, proteína plasmática transportadora de ferro, é controlada geneticamente por mais de 20 alelos (A, G, B, C, D, M e E), os quais variam segundo um sistema de alelos autossômicos múltiplo, evidenciando-se a expressão máxima de cada um no indivíduo heterozigótico (Rasmusen & Tucker, 1973 referido por Morris *et al.*, 1988). Num estudo levado a cabo por Loong *et al.*, 1986, no Ruakura Agricultural Centre, a frequência do alelo A da transferrina foi de 57%, no rebanho de ovinos resistentes à pitomicotoxicose, e de 10% no rebanho susceptível, já o alelo D apresentou frequência de 20% no rebanho resistente e 69% no rebanho susceptível. O alelo D parece estar relacionado com uma maior suscetibilidade, contudo as diferenças entre as linhas não é suficiente para tirar conclusões (Morris *et al.*, 2004).

Em 2008, Phua, *et al.*, desenharam um estudo genético, na raça Romney, cujo objetivo preliminar foi o de mapear os QTL, de forma a encontrar aqueles com efeito de tamanho detectável e, posteriormente identificar os genes responsáveis pela tolerância à pitomicotoxicose. Concluiu-se que os componentes genéticos aditivos das características In (GGT) e In (GDH) são determinados pelo efeito moderado a forte do QTL do cromossoma 3, e em parte pelo efeito minoritário de poligenes, como por exemplo, os quatro QTL sugestivos dos cromossomas 1, 8, 13 e 15, além de outros como o gene catalase e o gene ABCG2 (Phua *et al.*, 1999; Duncan *et al.*, 2007; Phua *et al.*, 2008).

#### 1.1.3.13.9.7. Genes candidatos

Os estudos de genes candidatos, nos quais se aprofundou o conhecimento pelo gene da catalase<sup>16</sup> e o gene ABCG2, teve por base a influência relevante que estes podiam exercer na patogenia da pitomicotoxicose (Phua *et al.*, 2014b).

O estudo do gene da catalase na resistência à pitomicotoxicose deve-se ao facto deste codificar uma enzima com ação antioxidante que pode intervir na formação dos radicais livres resultantes da presença da esporidesmina. Foram isolados dois marcadores microssatélite OarSHP3 e OarSHP4 que ladeiam o gene da catalase no cromossoma 15 dos ovinos. Onze marcadores informativos do cromossoma 15, incluindo o OarSHP4, não revelaram qualquer relação com as características da doença em quatro *outcross pedigrees*, ainda que a frequência dos alelos OarSHP3 e OarSHP4 tenha diferenças significativas entre as linhagens de ovinos selecionadas (resistentes *versus* suscetíveis). Esta diferença entre os resultados do *outcross pedigree* e das linhas de seleção pode evidenciar o carácter recessivo do gene da catalase ou pelo menos uma influência menor na determinação da resistência, ou seja, o nível de expressão do gene é crucial. Os resultados desanimadores dos *outcross pedigrees* podem dever-se à pouca expressão do alelo recessivo quando este apresenta baixa frequência na população, além de que alelos de genes com efeito menor na característica podem perder a sua expressão em estudos de ligação de marcadores com características em *outcross pedigrees*, especialmente quando a característica é poligénica como é o caso da resistência/suscetibilidade à pitomicotoxicose. A existência de divergência significativa nas linhas de seleção (resistente/suscetível) no que toca à frequência dos alelos OarSHP3 e OarSHP4, juntamente com o facto do gene da catalase ser funcional no impedimento da toxicidade da esporidesmina corrobora o seu envolvimento no mecanismo de resistência, o qual é também apoiado pela maior atividade da catalase nos eritrócitos dos animais resistentes (Phua *et al.*, 1999; Phua *et al.*, 2014a).

O gene que codifica a proteína ABCG2, pertencente à superfamília *ATP-Binding cassette* (ABC), a qual se pensa estar envolvida no transporte da fitoporfirina para a bÍlis, não mostrou diferenças na sua expressão entre animais suscetíveis e resistentes num teste de *Hibridação Northern*<sup>17</sup>, contudo nas linhas de seleção genética evidenciou-se uma diferença significativa ( $P=0,044$ ) na frequência alélica do *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)<sup>18</sup> ss65824074:G>A do gene ABCG2, na linha suscetível a frequência alélica é 0,17, na linha resistente é de 0,52 e na linha

---

<sup>16</sup> Catalase: enzima tetramérica da heme presente em todos os organismos aeróbios, encontrada principalmente nos peroxissomas das células dos mamíferos. Juntamente com a glutatona peroxidase converte peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular (Deisseroth & Dounce 1970 e Yu, 1994 referidos por Phua, *et al.*, 1999)

<sup>17</sup> Hibridação Northern é um método laboratorial para deteção de moléculas específicas de ácido ribonucleico (ARN), em que se analisa um determinado tecido ou tipo de células com o objetivo de mensurar a expressão de ARN de determinados genes. O processo inicia-se com a desnaturação das cadeias ARN as quais são separadas posteriormente por eletroforese de acordo com o seu tamanho. As cadeias são transferidas para uma membrana onde são expostas a sondas complementares ao gene em estudo e que estão marcadas com corante fluorescente ou radioativamente, o que permite a deteção, por exemplo com autoradiografia das moléculas ARN de interesse (Nature Education, 2014).

<sup>18</sup> SNP representa a variação numa única posição em determinada sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN). Se mais do que 1% da população não possuir o mesmo nucleótido em determinada posição específica da sequência de ADN, pode considerar-se a existência de um SNP (Nature Education, 2014).

controle é 0,58. Os haplótipos<sup>19</sup> que compõem os três SNP do gene ABCG2 revelam uma associação forte ( $P=0,03$ ) com as linhas de seleção de animais (Duncan *et al.*, 2007; Campbell, *et al.*, 2010). Num estudo das linhas de seleção da raça ovina Romney foram avaliados 50975 SNP, sendo que apenas três mostraram uma frequência alélica significativamente diferente entre as linhas de seleção ( $P<0,000001$ ). Também neste estudo se concluiu uma relevância, possivelmente superior do gene ABCG2 na conferência de resistência em relação ao gene da catalase uma vez que 43% dos SNP com 1 Mb estão próximos do gene ABCG2 ( $P$  value mínimo de 0,001), enquanto que apenas 38% se encontram próximos do gene da catalase ( $P$  value mínimo de 0,02) (Phua *et al.*, 2014b).

Recentemente, a genotipagem de ovinos da raça Romney com o *kit* de análise Illumina OvineSNP50 BeadChip permitiu prever a resistência à pitomicototoxicose baseando-se na avaliação genômica. Este método permite uma previsão da resposta do indivíduo à esporidesmina a baixo custo, sem intervenção invasiva ou lesiva e contemporânea da avaliação de outras características. A melhor previsão genômica é de 0,38 para a raça Romney, não superando a previsão individual com base na administração de esporidesmina que é 0,64, contudo o animal não é exposto a processos mais danosos do que em qualquer outra ação profilática própria da rotina de uma exploração. O valor genômico deve ser revisto anualmente devido à variação dos animais entre si ao longo do tempo e à possível recombinação entre os marcadores SNP e os *loci* interveniente na resistência/suscetibilidade à pitomicototoxicose (Phua *et al.*, 2014b)

## 2. Objetivos

---

O arquipélago dos Açores, um dos dois portugueses, é constituído por nove ilhas distribuídas por três grupos. O grupo oriental composto pelas ilhas de S. Miguel e Santa Maria, o grupo central do qual fazem parte Pico, S. Jorge, Faial, Terceira e Graciosa e o grupo ocidental constituído pelas ilhas das Flores e Corvo. Os Açores encontram-se na zona norte do Oceano Atlântico entre as longitudes 24° 45' 15" e 31° 16' 02" Oeste e as latitudes 36° 55' 43" e 39° 43' 02" Norte. A área de superfície total do arquipélago é 2332 Km<sup>2</sup>, sendo a ilha mais pequena a do Corvo contrastando com a ilha de S. Miguel, a maior (Dir. Reg. Orden. Territ. e Rec. Híd., 2005). O clima do arquipélago é do tipo oceânico (IPMA, 2015).

Desde a descoberta da pitomicototoxicose no arquipélago dos Açores (Ilhas Terceira e de S. Miguel), entre 1999-2001, isto é, desde o estabelecimento da relação de casos de fotossensibilidade com a micotoxina produzida pelo fungo *P. chartarum*, que a importância da doença se tem manifestado em cada ano, em maior ou menor grau.

---

<sup>19</sup> Haplótipos são grupos de genes de um indivíduo herdados do mesmo progenitor em conjunto, podem referir-se a um par de genes, a todos os genes de um cromossoma ou a um grupo de SNP (Nature Education, 2014).

Os propósitos seguidamente apresentados são comuns às duas ilhas, S. Miguel e Terceira.

Os objetivos da presente investigação centram-se por um lado na perceção e avaliação da distribuição anual dos casos de lesões dermatológicas em bovinos enviados para abate no matadouro desde que há registos (estudo retrospectivo). Por outro lado, incide na avaliação do fígado de bovinos aparentemente saudáveis, em contexto de matadouro, de modo a obter a frequência de lesões hepáticas compatíveis com pitomicotoxicose na amostra estudada.

De uma forma mais específica, no estudo retrospectivo pretende-se perceber a variação da frequência de animais, que entram no matadouro, com lesões dermatológicas de índole fotossensível (lesões agudas), ao longo do ano tendo em conta as diversas estações (Primavera, Verão, Outono e Inverno). Pretende-se, também, avaliar a frequência de animais com lesões dermatológicas crónicas (HPQ) que deram entrada no matadouro para abate e a sua variação nos diferentes anos. Dos animais com lesões dermatológicas, agudas e/ou crónicas, deseja-se perceber qual o resultado da avaliação dos seus fígados (aprovação ou rejeição), e quais as causas de rejeição hepática ou da carcaça na totalidade quando esta condição de avaliação (rejeição) se verifica.

No estudo desenvolvido ao longo do estágio, de forma presencial na linha de abate dos matadouros, objetiva-se compreender os vários graus de lesão hepática compatível com a pitomicotoxicose e a sua relação com as características produtivas da carcaça, conformação, teor de gordura e peso da carcaça a quente, assim como com características intrínsecas de cada animal, como é o caso da idade. Durante a permanência na linha de abate a recolha de amostras de fígado para análise histopatológica, permitirá a comparação e categorização das lesões dos fígados observados com as lesões descritas na bibliografia.

Estando aberta a possibilidade de aceder ao arquivo da casuística do departamento de serviços veterinários da União das Cooperativas de Lacticínios da Ilha Terceira (UNICOL) e às contagens de esporos das pastagens da mesma ilha, espera-se conseguir relacionar o maior número, em determinados períodos do ano, de consultas devidas a FTS com o aumento do número de esporos de *P. chartarum* das pastagens. Também a relação entre o número de casos de FTS no matadouro da Ilha Terceira e a contagem de esporos na pastagem será estudada.

Em suma, os objetivos são elaborar dois estudos em cada ilha (Terceira e S. Miguel), um de cariz retrospectivo, utilizando os dados de arquivo dos matadouros, e outro elaborado ao longo do estágio por observação direta da linha de abate. Na Ilha Terceira ambiciona-se ainda perceber a variação anual dos casos clínicos e no matadouro de FTS aguda e a sua relação com as contagens de esporos da pastagem.

### 3. Materiais e métodos

---

#### 3.1. Estudo retrospectivo

Para a elaboração do estudo retrospectivo, em ambos os matadouros – Ilha de S. Miguel e Terceira, foi permitida a consulta do arquivo dos dados relativos ao abate de bovinos. Os arquivos encontravam-se em suporte papel, exceto casos pontuais. O armazenamento dos dados recolhidos foi feito em suporte digital (Microsoft Excel®).

A informação recolhida incidiu sobre todos os animais (bovinos) que à inspeção *ante mortem* apresentaram sinais dermatológicos de FTS e/ou HPQ. Assim, registou-se o ano, mês e dia de entrada do animal no matadouro, o número constante na marca auricular do animal, o resultado da inspeção *ante mortem* (FTS e/ou HPQ), o resultado da inspeção hepática e da carcaça e as causas de rejeição (fígado e carcaça) quando esta se verificou. Na Ilha de S. Miguel os dados compreendem o período entre 2008 e 2014 e na Ilha Terceira entre 2005 e 2014 (Tabela 13).

Na Ilha Terceira foi possível o acesso à casuística, referente aos casos de FTS, no arquivo digital do departamento veterinário da UNICOL, assim conseguiu-se a informação da data da consulta, número constante da marca auricular e número da exploração, estando os dois últimos, por vezes, ausentes. Estes dados iniciam-se no ano de 2004 e finalizam no ano de 2014 (Tabela 13).

Os dados das contagens de esporos da pastagem ao longo dos anos foram cedidos pelo Laboratório Regional de Veterinária (Ilha Terceira) e têm início em 2001, terminando em 2014 (Tabela 13). As contagens de esporos são monitorizadas em duas pastagens de duas freguesias da Ilha Terceira, Altares e Achada. Os dados cedidos indicam a data de recolha e o número de esporos por grama de erva da pastagem analisada.

Tabela 13: Informação sobre os estudos retrospectivos.

<b>Ilha em estudo</b>	<b>Período de estudo</b>	<b>Local de recolha dos dados do estudo</b>	<b>Amostra do estudo</b>
S. Miguel	2008 - 2014	Matadouro	1531 animais
Terceira	2005 - 2014	Matadouro	751 animais
Terceira	2004 - 2014	UNICOL	601 consultas
Terceira	2001 - 2014	Laboratório Regional de Veterinária	338 contagens de esporos das pastagens

#### 3.2. Estudo no matadouro

O estudo no matadouro da Ilha de S. Miguel iniciou-se em Setembro e terminou em Dezembro de 2014, já no matadouro da Ilha Terceira, começou em Janeiro e terminou em Fevereiro de

2015 (Tabela 14). O procedimento de observação e recolha de informação foi idêntico nas linhas de abate dos dois matadouros, tendo a recolha de amostras sido efetuada apenas no matadouro de Ilha S. Miguel. Os animais avaliados no matadouro pertenciam na totalidade à antiga categoria D (Regulamento (CE) 1249/2008, 2008), atualmente E (Regulamento de Execução 148/2014, 2014), ou seja, às fêmeas já paridas da espécie bovina.

Tabela 14: Informação sobre os estudos em matadouro.

<b>Ilha em estudo</b>	<b>Amostra em estudo (n.º de animais)</b>
S. Miguel	1331
Terceira	410

O procedimento iniciava-se com a visita à abegoaria para inspeção *ante mortem* e sinalização dos animais de categoria E com lesões agudas de FTS e/ou HPQ. Após o início do abate, a inspeção prosseguia na linha, mais precisamente, no local de inspeção das vísceras por parte do Inspetor Sanitário, onde era possível observar e participar na visualização, palpação e corte do fígado. Quando necessário, o órgão em questão, era retirado da linha para inspeção mais pormenorizada e recolha de amostras para histopatologia no final do dia de abate.

Na inspeção visual do fígado (Figura 10) avaliou-se o tamanho, forma, coloração, alterações estruturais e morfológicas, equilíbrio nas proporções dos lobos e pesquisa de alterações compatíveis com um estado lesional do órgão. Na palpação do fígado (Figura 11) avaliou-se a consistência do parênquima, a textura da superfície do órgão e a resistência à deformação provocada pelo toque e palpação. Após incisão do órgão (Figura 12) explorou-se o parênquima hepático e avaliaram-se os canais biliares (conteúdo e parede).



Figura 10: Inspeção visual do fígado - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014



Figura 11: Inspeção por palpação do fígado - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014



Figura 12: Incisão do fígado para inspeção do parênquima - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014



Figura 13: Fragmentos de fígado para análise histopatológica - Matadouro de S. Miguel 18/11/2014

Dos fígados observados foram registadas as diversas alterações que cada um apresentou, a sua aprovação ou rejeição e a causa apontada. Quando os fígados apresentavam fibrose/esclerose (F/E), o grau desta alteração era anotado (ligeiro - I, moderado - II, intenso - III, severo - IV) e a sua compatibilidade com a pitomicotoxicose também (Tabela 15).

As amostras de fígado enviadas para o Departamento de Patologia do Laboratório Regional de Veterinária, na Ilha Terceira, para análise histopatológica consistiam em três fragmentos: um da face diafragmática, um da face visceral e um do bordo do fígado mais afetado pela fibrose. Estas foram enviadas numa proporção de 1:10 em formaldeído a 10% (Figura 13).

Dos animais cujos fígados foram inspecionados teve-se acesso à sua idade, número constante da marca auricular, ao peso da carcaça a quente, à avaliação da conformação SEUROP e da gordura da carcaça (Regulamento (CE) 1249/2008, 2008), às vísceras reprovadas, ao resultado da inspeção da carcaça (reprovada, aprovada, aprovada parcialmente ou sob observação) e à causa rejeição da carcaça quando esta se verificou.

Tabela 15: Descrição das alterações macroscópicas compatíveis com pitomicotoxicose e a sua categorização em quatro graus.

<b>Grau de lesão</b>	<b>Alterações</b>
0	Órgão sem alterações à inspeção visual nem à palpação.
I (Figura 14)	Órgão com manutenção da estrutura fisiológica e aumento ligeiro da consistência do parênquima.
II (Figura 15 e 16)	Órgão com forma menos longilínea do que no seu estado fisiológico. Aumento de consistência e palidez dos bordos.
III (Figura 17)	Órgão com forma mais globosa do que o grau anterior e mais longilínea do que o grau seguinte. Palidez e espessamento da cápsula de Glisson. Aumento da consistência do parênquima, especialmente dos bordos.
IV (Figura 18 e 19)	Órgão com forma globosa, sem distinção dos lobos, espessamento e palidez muito visível da cápsula de Glisson. Aumento muito evidente da consistência de todo o parênquima.

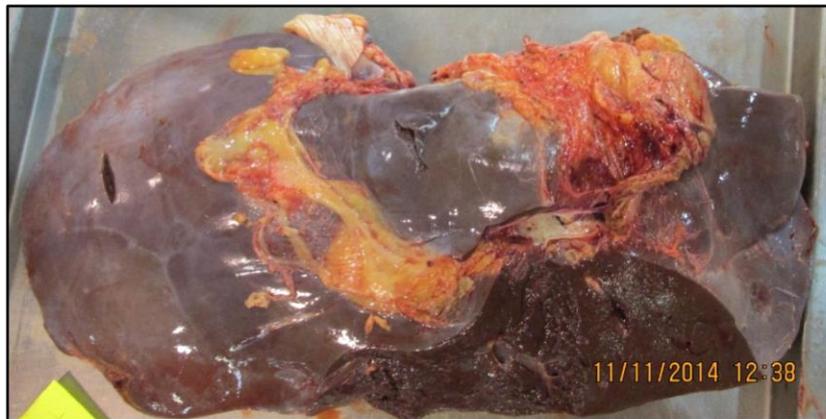


Figura 14: Fígado classificado com grau I de lesão hepática compatível com pitomicotxicose.



Figura 15: Fígado classificado com grau II de lesão hepática compatível com pitomicotxicose.



Figura 16: Fígado classificado com grau II de lesão hepática compatível com pitomicotxicose, onde é visível a palidez e fibrose do bordo do lobo esquerdo.



Figura 17: Fígado classificado com grau III de lesão hepática compatível com pitomicotxicose.



Figura 18: Fígado classificado com grau IV de lesão hepática compatível com pitomicotxicose.



Figura 19: Fígado classificado com grau IV de lesão hepática compatível com pitomicotxicose.

## 4. Resultados

### 4.1. Estudo retrospectivo

#### 4.1.1. Ilha de S. Miguel

No estudo retrospectivo elaborado com os dados fornecidos pelo matadouro da Ilha de S. Miguel estudaram-se sete anos (2008 a 2014). O número total de bovinos abatidos nos sete anos foi de 151790 animais, em média 21684 ao ano, variando entre um mínimo de 18495, em 2008, e um máximo de 25531, em 2014. O número de animais abatidos cuja inspeção *ante mortem* revelou sinais dermatológicos como FTS e/ou HPQ foi de 1531, em média 218 ao ano, variando entre um mínimo de 108 em 2014 e um máximo de 317 em 2013. A frequência anual de bovinos com FTS e/ou HPQ no matadouro assumiu valores em torno de 1% (Tabela 16).

Tabela 16: Ano, número de bovinos abatidos por ano, número de bovinos abatidos com FTS e/ou HPQ por ano, frequência anual de bovinos abatidos com FTS e/ou HPQ

Ano	Número de bovinos abatidos (SREA, 2015)	Número de bovinos com FTS e/ou HPQ	Frequência de bovinos com FTS e/ou HPQ
2008	18495	230	≈1,24%
2009	19103	188	≈0,98%
2010	20464	249	≈1,22%
2011	21729	218	≈1,00%
2012	21904	221	≈1,01%
2013	24564	317	≈1,29%
2014	25531	108	≈0,42%
Total	151790	1531	≈1,01%

Dos 1531 animais abatidos entre 2008 e 2014 com FTS e/ou HPQ, 53,76% (823 animais) apresentaram FTS, 43,17% (661 animais) apresentaram HPQ e 3,07% (47 animais) apresentavam ambas as alterações (Gráfico 2)

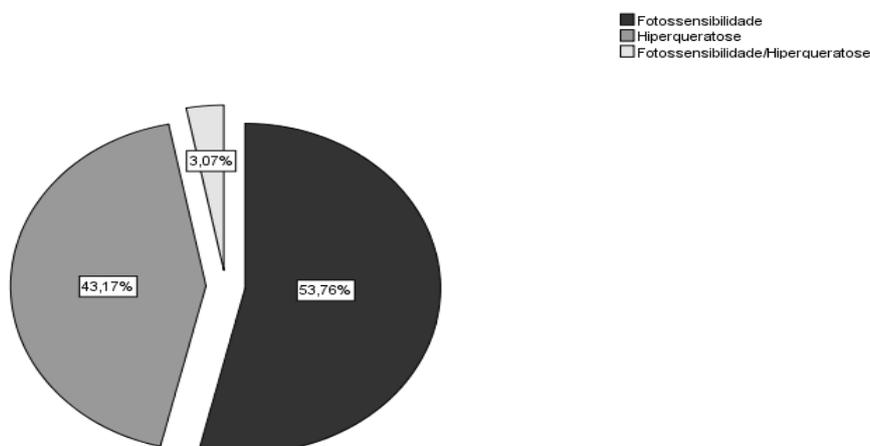


Gráfico 2: Frequência de animais com FTS, HPQ ou ambas durante os anos estudados.

A distribuição dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos anos estudados é apresentada no Gráfico 3. Foi 2013 o ano em que se registaram mais casos de FTS (186 casos), seguido do ano de 2008 (134 casos) e do ano 2010 (132 casos), o ano em que se registaram menos casos foi em 2014 (35 casos). A par da FTS, também os casos de HPQ registaram os máximos em 2013 (131 casos), seguido de 2012 (110 casos) e de 2010 (105 casos), o menor registo verificou-se em 2014 (73 casos). O número de casos FTS/HPQ e teve o seu máximo em 2008 (18 casos) e o mínimo em 2013 e 2014 (0 casos).

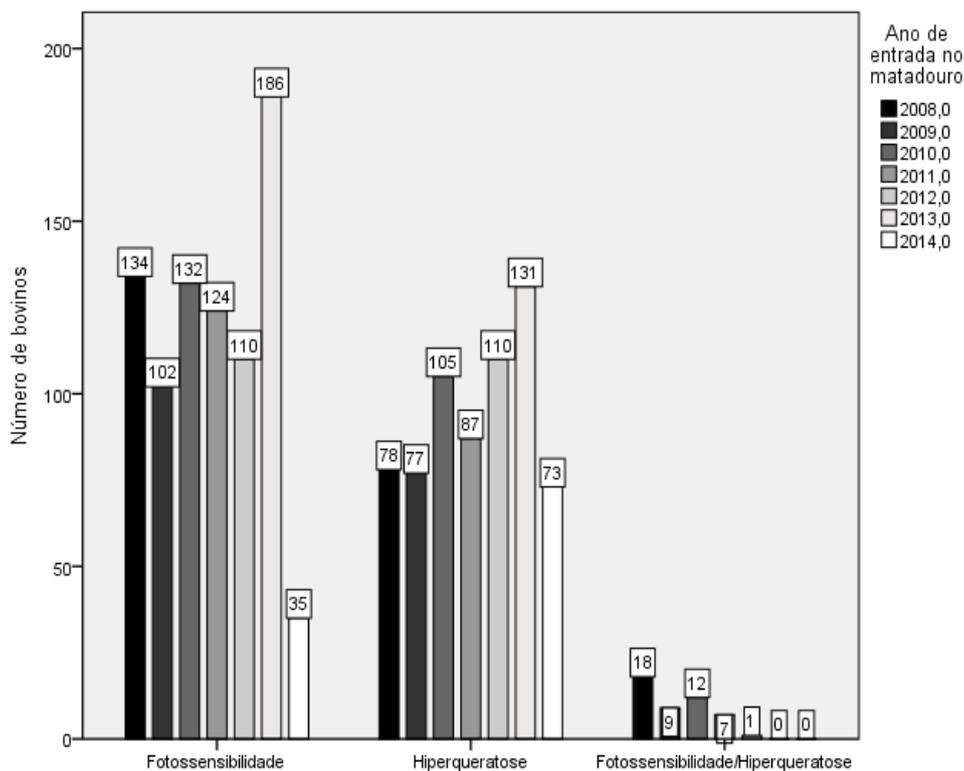


Gráfico 3: Distribuição do número de casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos anos estudados.

A distribuição acumulada dos vários anos do estudo dos casos de FTS, HPQ ou ambas em cada mês é representada no Gráfico 4. Os meses em que se verificou a entrada no matadouro de mais animais com FTS foram Outubro (118 casos), seguido de Setembro (97 casos) e Maio (79 casos), o mês com menos casos foi Fevereiro (42 casos). No caso da HPQ, o mês com mais entradas foi Novembro (79 casos), seguido de Outubro (72 casos) e de Abril (66 casos), o mês com menos casos foi Dezembro (33 casos). Quanto aos casos em que os animais apresentavam FTS e HPQ nenhum mês se evidencia, variando entre um e o oito animais por mês.

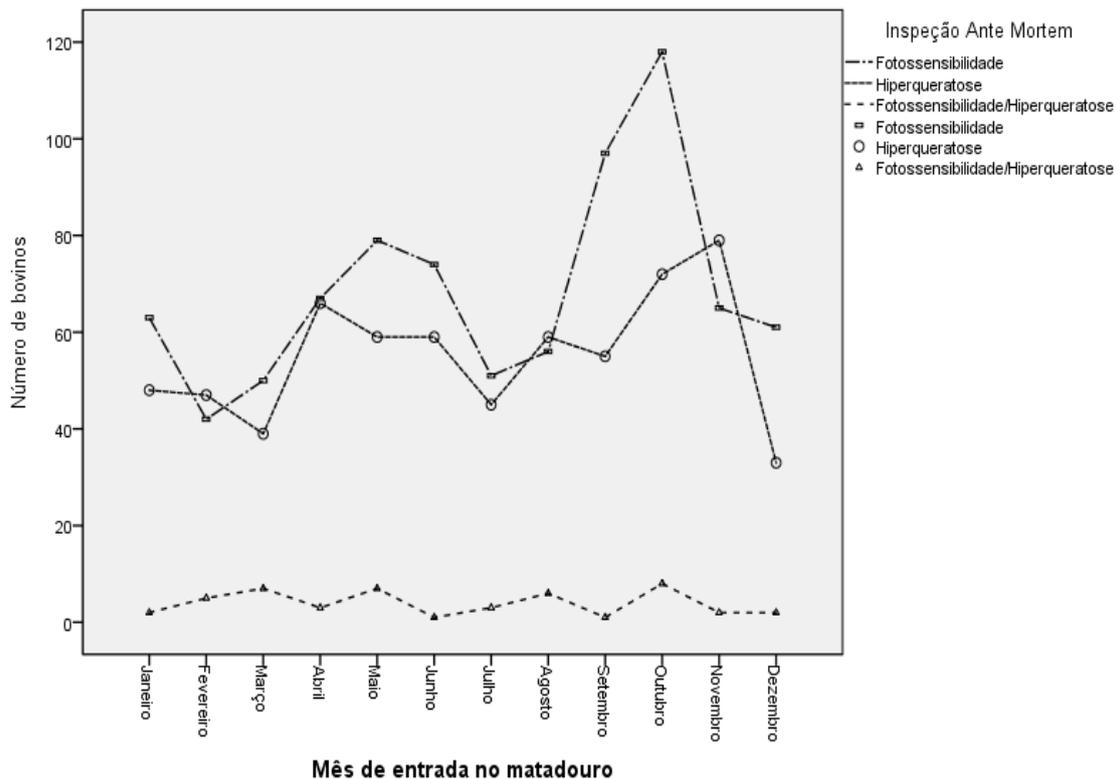


Gráfico 4: Distribuição acumulada dos anos estudados dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos meses.

Dos 1531 bovinos que entraram no matadouro com FTS, HPQ ou ambas, 18,81% (288 carcaças) tiveram a sua carcaça rejeitada após inspeção *post mortem* e 13,39% (205 carcaças) foram rejeitados em vida. Dos 1531 fígados só 6,47% (99 fígados) foram aprovados e os restantes 93,53% (1432 fígados) rejeitados, sendo que 32,2% (493 fígados) foram rejeitados devido à rejeição das carcaças (*ante* ou *post mortem*) e 61,33% (939 fígados) devido a inspeção hepática. As três causas restantes de rejeição hepática mais frequentes foram a F/E com 31,03% (475 fígados), a telangiectasia com 9,01% (138 fígados) e a parasitose com 7,71% (118 fígados) (Gráfico 5). Na Tabela 17 apresenta-se a distribuição das causas para cada tipo de inspeção *ante mortem*.

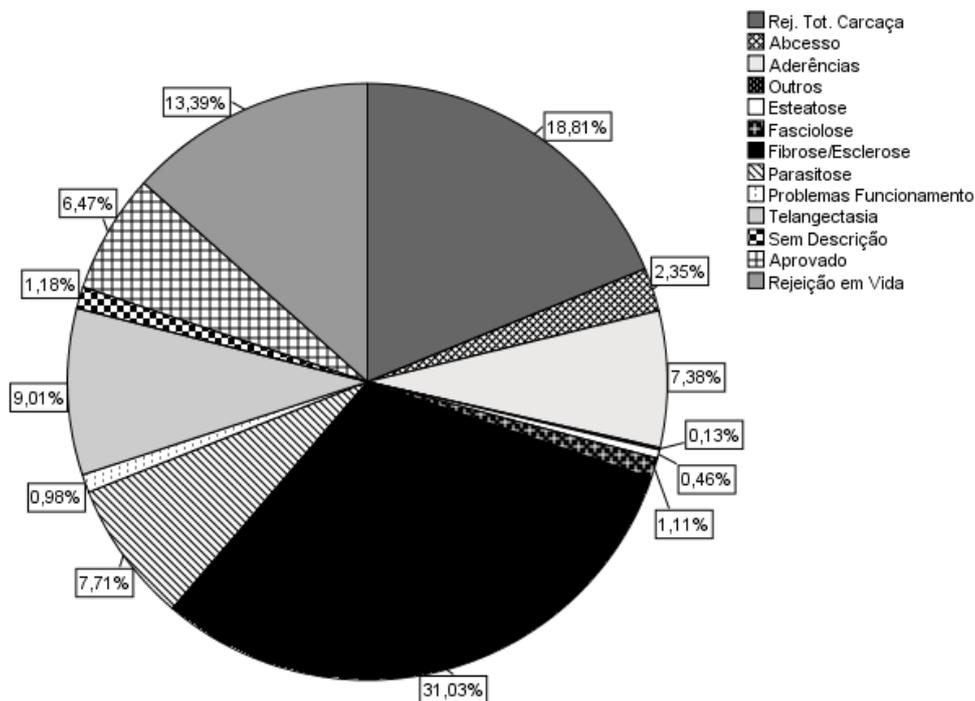


Gráfico 5: Distribuição das causas de rejeição hepática de todos os animais com FTS, HPQ ou ambas.

Tabela 17: Distribuição do número total de animais, de animais rejeitados *ante e post mortem*, dos fígados aprovados e rejeitados e das três causas de rejeição hepática mais frequentes por cada tipo de inspeção *ante mortem*

	FTS	HPQ	FTS e HPQ
<b>N.º total de animais</b>	824	661	46
<b>Rejeição <i>ante mortem</i></b>	190 carcaças (23,06%)	15 carcaças (2,27%)	-
<b>Rejeição <i>post mortem</i></b>	162 carcaças (19,66%)	117 carcaças (17,7%)	9 carcaças (19,57%)
<b>Rejeição da carcaça (<i>ante e post mortem</i>)</b>	352 carcaças (42,72%)	132 carcaças (19,97%)	9 carcaças (19,57%)
<b>Fígados aprovados</b>	72 fígados (8,74%)	26 fígados (3,93%)	1 fígado (2,17%)
<b>Fígados rejeitados</b>	752 fígados (91,26%)	635 fígados (96,07%)	45 fígados (97,83%)
<b>1.ª Causa de rejeição hepática mais frequente</b>	Rejeição da carcaça – 352 fígados (46,81%)	Fibrose/esclerose – 236 fígados (37,17%)	Fibrose/esclerose – 21 fígados (46,67%)
<b>2.ª Causa de rejeição hepática mais frequente</b>	Fibrose/esclerose – 218 fígados (28,99%)	Rejeição da carcaça – 132 fígados (20,79%)	Rejeição da carcaça – 9 fígados (20%)
<b>3.ª Causa de rejeição hepática mais frequente</b>	Parasitose - 52 fígados (6,91%)	Telangiectasia – 90 fígados (14,17%)	Aderências – 5 fígados (11,11%)
<b>1.ª Causa de rejeição da carcaça mais frequente</b>	Fotossensibilidade aguda – 126 carcaças (35,8%)	Neoplasia da bexiga – 45 carcaças (34,09%)	Neoplasia da bexiga – 3 carcaças (33,33%)
<b>2.ª Causa de rejeição da carcaça mais frequente</b>	Anemia/caquexia /emaciação -108 carcaças (30,68%)	Anemia/caquexia /emaciação – 31 carcaças (23,48%)	Causas não referidas – 3 carcaças (33,33%)

Dos 1531 bovinos abatidos com FTS, HPQ ou ambas, 67,8% (1038 carcaças) tiveram as suas carcaças aprovadas. Assim, 32,2% (493 carcaças) das carcaças foram reprovadas, principalmente por anemia, caquexia e emaciação (9,14% - 140 carcaças), FTS aguda (8,30% - 127 carcaças) e neoplasia da bexiga (4,51% - 69 carcaças) (Gráfico 6). As causas de rejeição da carcaça específicas de cada tipo de inspeção *ante mortem* estão referidas na Tabela 17.

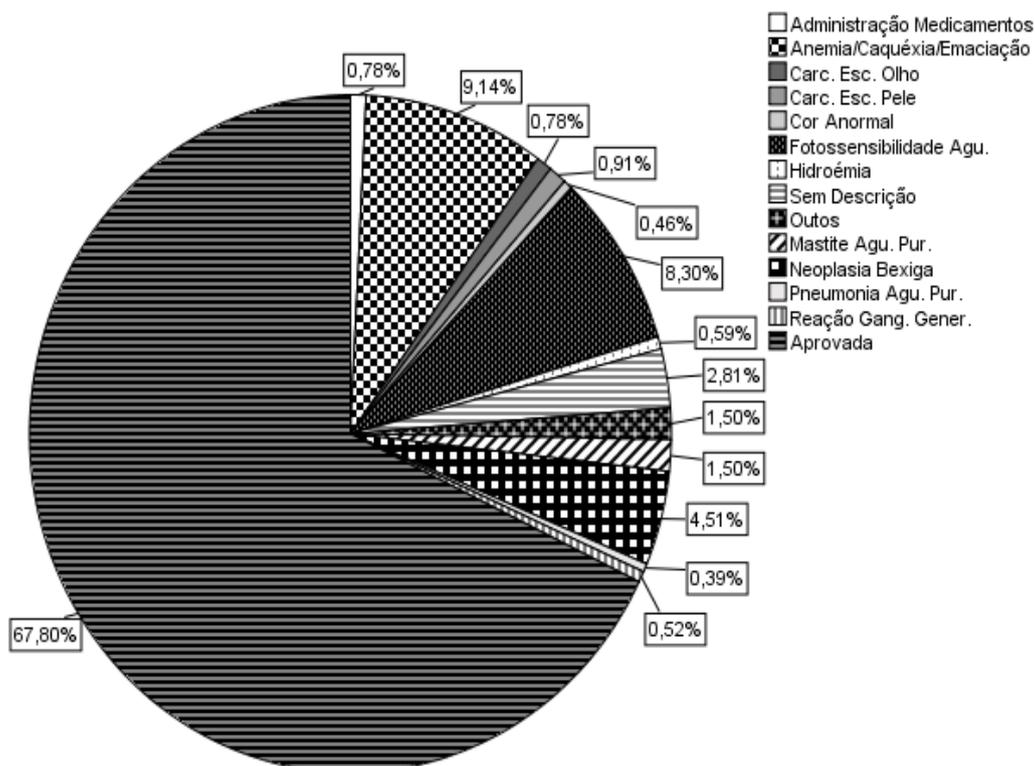


Gráfico 6: Distribuição, em percentagem, da aprovação e causas de rejeição das carcaças rejeitadas *ante e post mortem*.

#### 4.1.2. Ilha Terceira

No estudo retrospectivo elaborado com os dados fornecidos pelo matadouro da Ilha Terceira estudaram-se dez anos (2005 a 2014). O número total de bovinos abatidos nos dez anos foi de 157795 animais, em média 15779 ao ano, variando entre um mínimo de 10172, em 2005, e um máximo de 21874, em 2013. O número de animais abatidos cuja inspeção *ante mortem* revelou sinais dermatológicos como FTS e/ou HPQ foi de 751, em média 75 ao ano, variando entre um mínimo de 38 em 2014 e um máximo de 121 em 2007. A frequência anual de bovinos com FTS e/ou HPQ assumiu valores bastante constantes, em torno de 0,48% (Tabela 18).

**Tabela 18: Ano, número de bovinos abatidos por ano, número de bovino abatidos com FTS e/ou HPQ por ano, frequência anual de bovinos abatido com FTS e/ou HPQ**

Ano	Número de bovinos abatidos (SREA, 2015)	Número de bovinos com FTS e/ou HPQ	Frequência de bovinos com FTS e/ou HPQ
2005	10172	59	≈0,58%
2006	11565	66	≈0,57%
2007	13043	121	≈0,93%
2008	14166	89	≈0,63%
2009	16390	106	≈0,65%
2010	16255	78	≈0,48%
2011	17569	90	≈0,51%
2012	19729	51	≈0,26%
2013	21874	53	≈0,24%
2014	17022	38	≈0,22%
Total	157795	751	≈0,48%

Dos 751 animais abatidos, entre 2005 e 2014, com FTS e/ou HPQ, 56,72% (426 animais) apresentaram FTS, 41,68% (313 animais) apresentavam HPQ e 1,60% (12 animais) apresentavam ambas as alterações (Gráfico 7).

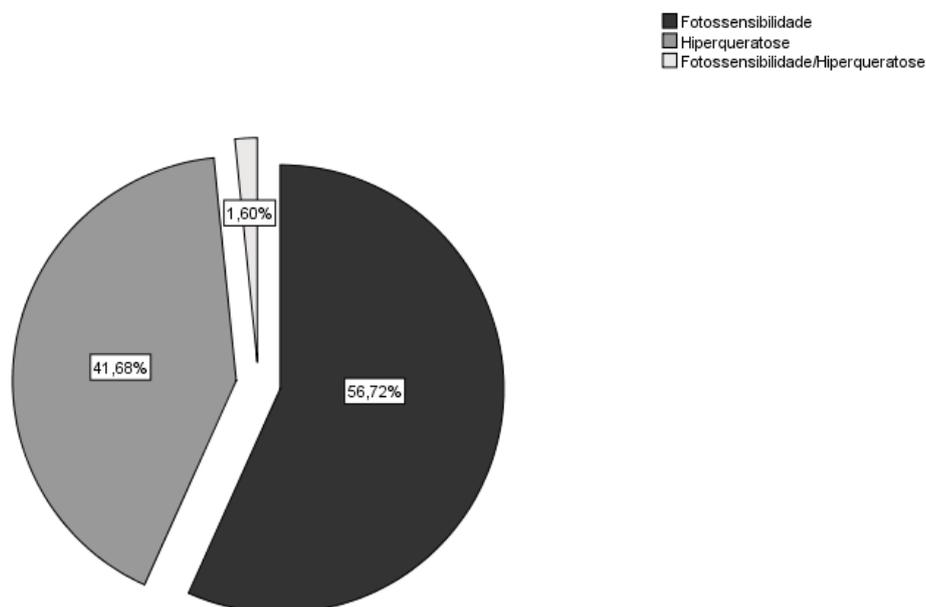


Gráfico 7: Frequência de animais com FTS, HPQ ou ambas durante os anos estudados.

A distribuição dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos anos estudados é apresentada no Gráfico 8. Em 2007 foi o ano em que se registaram mais casos de FTS (74 casos), seguido do ano de 2009 (60 casos) e do ano 2008 (49 casos), o ano em que se registaram menos casos foi em 2014 (21 casos). A HPQ apresentou um número máximo em 2011 (51 casos), seguido de 2007 (46 casos) e de 2009 (45 casos), o menor registo verificou-se em 2014 (16 casos). O

número de casos FTS/HPQ teve o seu máximo em 2013 e 2011 (3 casos) e o mínimo em 2005 e 2008 (0 casos).

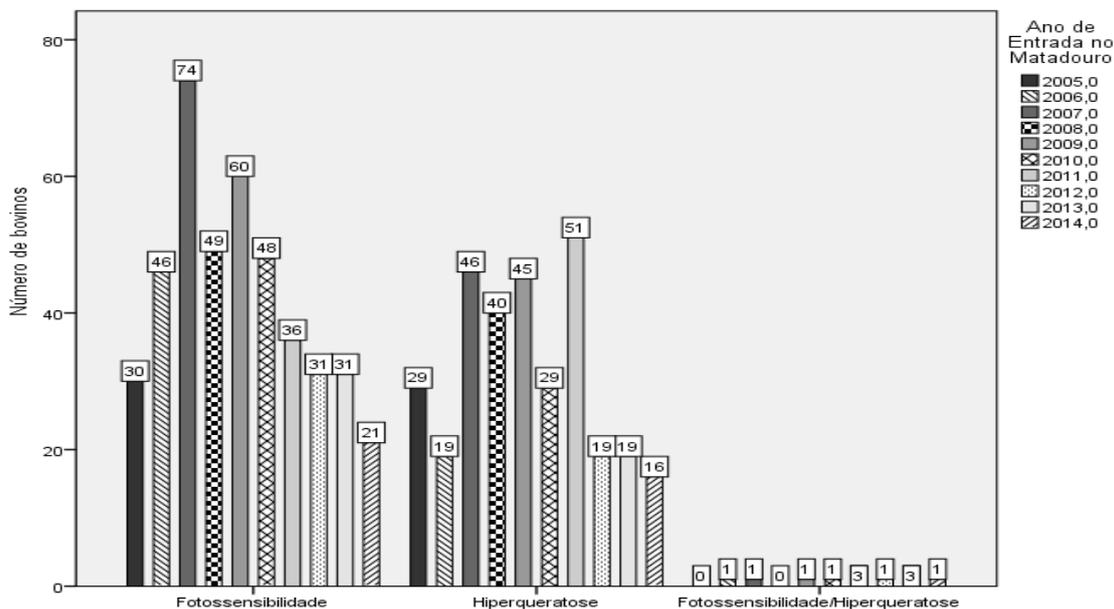


Gráfico 8: Distribuição do número de casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos anos estudados.

A distribuição acumulada dos vários anos do estudo dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos meses está representada no Gráfico 9. Os meses em que se verificou a entrada no matadouro de mais animais com FTS foram Novembro e Junho (48 casos), seguido de Julho (44 casos) e Abril (43 casos), o mês com menos casos foi Setembro (23 casos).

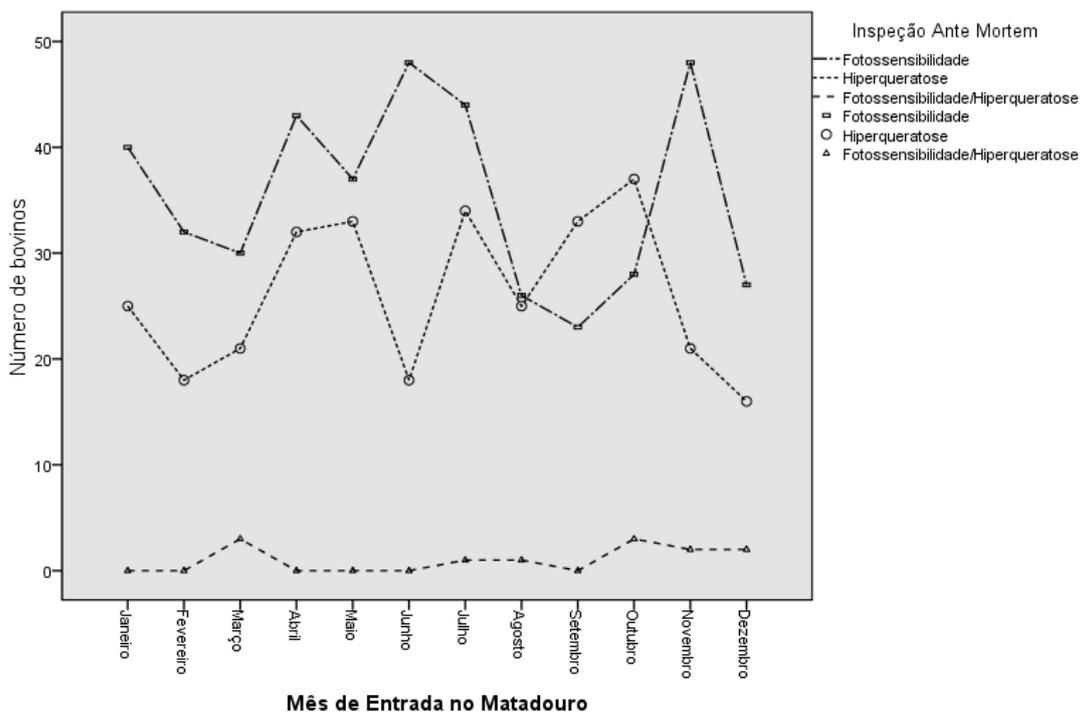


Gráfico 9: Distribuição acumulada dos anos estudados dos casos de FTS, HPQ ou ambas ao longo dos meses.

No caso da HPQ, o mês com mais entradas foi Outubro (37 casos), seguido de Julho (34 casos) e de Maio e Setembro (33 casos), o mês com menos casos foi Dezembro (16 casos). Quanto aos casos de FTS/HPQ nenhum mês se evidencia, variando entre zero e três animais por mês.

Dos 751 bovinos que entraram no matadouro com FTS, HPQ ou ambas, 11,45% (86 carcaças) tiveram a sua carcaça rejeitada após inspeção *post mortem* e 0,4% (3 carcaças) foram rejeitados em vida. Foram aprovados 21,7% (163 fígados) dos fígados e rejeitados 78,3% (588 fígados), sendo que 11,85% (89 fígados) foram rejeitados devido à rejeição das carcaças (*ante* ou *post mortem*) e 66,44% (499 fígados) devido a inspeção hepática.

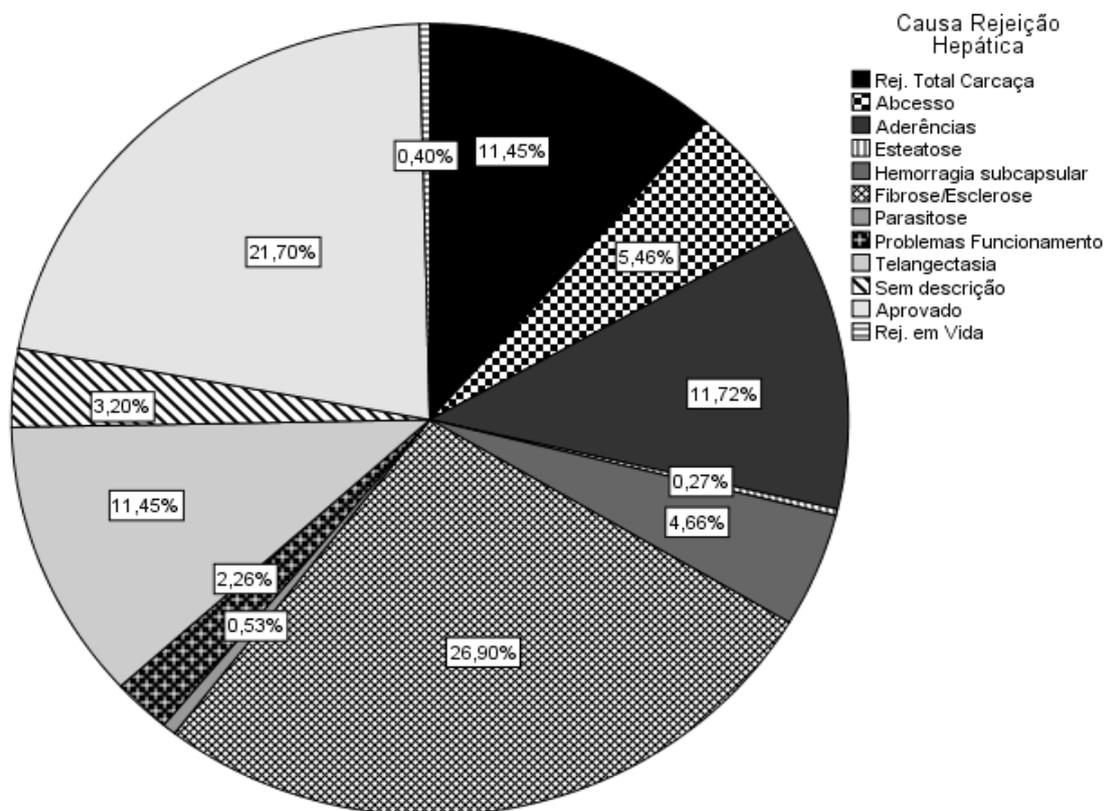


Gráfico 10: Distribuição das causas de rejeição hepática de todos os animais com FTS, HPQ ou ambas.

As três causas restantes de rejeição hepática mais frequentes foram a F/E com 26,9% (202 fígados), a aderências com 11,72% (88 fígados) e a telangiectasia com 11,45% (86 fígados) (Gráfico 10). Na Tabela 19 apresentam-se as estatísticas para os tipos de inspeção *ante mortem*.

Tabela 19: Distribuição do número total de animais, de animais rejeitados *ante* e *post mortem*, dos fígados aprovados e rejeitados e das três causas de rejeição hepática mais frequentes por cada tipo de inspeção *ante mortem*

	FTS	HPQ	FTS/HPQ
<b>N.º total de animais</b>	426	313	12
<b>Rejeição <i>ante mortem</i></b>	2 carcaças (0,47%)	1 carcaça (0,32%)	-
<b>Rejeição <i>post mortem</i></b>	35 carcaças (8,22%)	50 carcaças (15,97%)	1 carcaça (8,33%)
<b>Rejeição da carcaça (<i>ante</i> e <i>post mortem</i>)</b>	37 carcaças(8,69%)	51 carcaças (16,29%)	1 carcaças (8,33%)

<b>Fígados aprovados</b>	90 fígados (21,13%)	71 fígados (22,68%)	2 fígados (16,67%)
<b>Fígados rejeitados</b>	336 fígados (78,87%)	242 fígados (77,32%)	10 fígados (83,33%)
<b>1.ª Causa de rejeição hepática mais frequente</b>	Fibrose/esclerose – 144 fígados (42,86%)	Fibrose/esclerose – 56 fígados (23,14%)	Fibrose/esclerose – 2 fígados (20%) Aderências - 2 fígados (20%) Telangiectasia - 2 fígados (20%)
<b>2.ª Causa de rejeição hepática mais frequente</b>	Telangiectasia – 218 fígados (64,88%)	Rejeição da carcaça – 51 fígados (16,29%)	
<b>3.ª Causa de rejeição hepática mais frequente</b>	Aderências - 51 fígados (15,18%)	Telangiectasia – 48 fígados (21,07%)	
<b>1.ª Causa de rejeição da carcaça mais frequente</b>	Fotossensibilidade aguda – 13 carcaças (35,14%)	Carcinoma escamoso da pele – 25 carcaças (49,02%)	Hiperqueratose – 1 carcaças (100%)
<b>2.ª Causa de rejeição da carcaça mais frequente</b>	Anemia/caquexia /emaciação - 8 carcaças (21,62%)	Hiperqueratose – 4 carcaças (7,84%)	

Dos 751 bovinos abatidos com FTS, HPQ ou ambas, 88,15% (662 carcaças) tiveram as suas carcaças aprovadas. Assim, 11,85% (89 carcaças) das carcaças foram reprovadas, principalmente por carcinoma escamoso da pele (3,6% - 27 carcaças), fotossensibilidade aguda e anemia, caquexia e emaciação (1,73% - 13 carcaças cada causa) (Gráfico 11). As causas de rejeição da carcaça específicas de cada tipo de inspeção *ante mortem* estão referidas na Tabela 19.

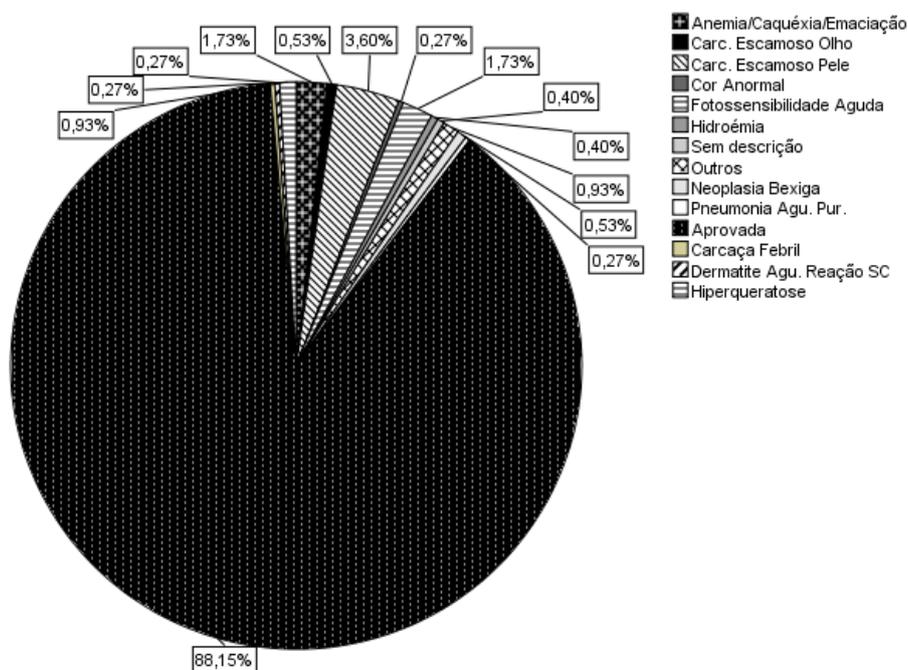


Gráfico 11: Distribuição, em percentagem, da aprovação e causas de rejeição das carcaças rejeitadas em *ante e post mortem*.

Os registos das contagens do número de esporos das pastagens, entre 2001 e 2014, nos quatro locais mensurados regularmente na Ilha Terceira estão apresentados no Gráfico 12. O número de esporos apresenta valores diferentes de zero, entre Junho e Novembro. Em 2004 e 2008 as contagens não revelaram a presença de esporos nas pastagens avaliadas. Em 2001, o número máximo de esporos foi de 180000 esporos/g de erva, na Achada a, durante o mês de Setembro. Em 2002, a contagem mais elevada verificou-se na Achada b, em Setembro, com 375000 esporos/g de erva. Em 2003 o pico foi de 545000 esporos/g de erva nos Altares a, em Outubro. Em 2005, o número máximo de esporos verificou-se na Achada b, em Setembro com 345000 esporos/g de erva. No ano de 2006, a Achada b apresentou o máximo do ano com 620000 esporos/g de erva, em Setembro. Em 2007, a contagem máxima verificou-se na Achada a, em Setembro, com 545000 esporos/g de erva. Em Setembro de 2009 registou-se a contagem máxima desse ano, 465000 esporos/g de erva nos Altares b. No ano de 2010, o número máximo da contagem de esporos foi de 835000 por g de erva nos Altares a, em Outubro. Em 2011, na Achada b, durante o mês de Setembro verificou-se o número máximo de esporos nesse ano com 495000 esporos/g de erva. Em 2012, no mês de Setembro, registou-se o máximo de 565000 esporos/g de erva nos Altares a. No ano de 2013, 680000 esporos/g de erva nos Altares a, em Setembro, foi a contagem máxima do ano. Por fim, no ano 2014, o número máximo registado nas contagens foi no mês de Setembro, nos Altares a e b com 245000 esporos/g de erva.

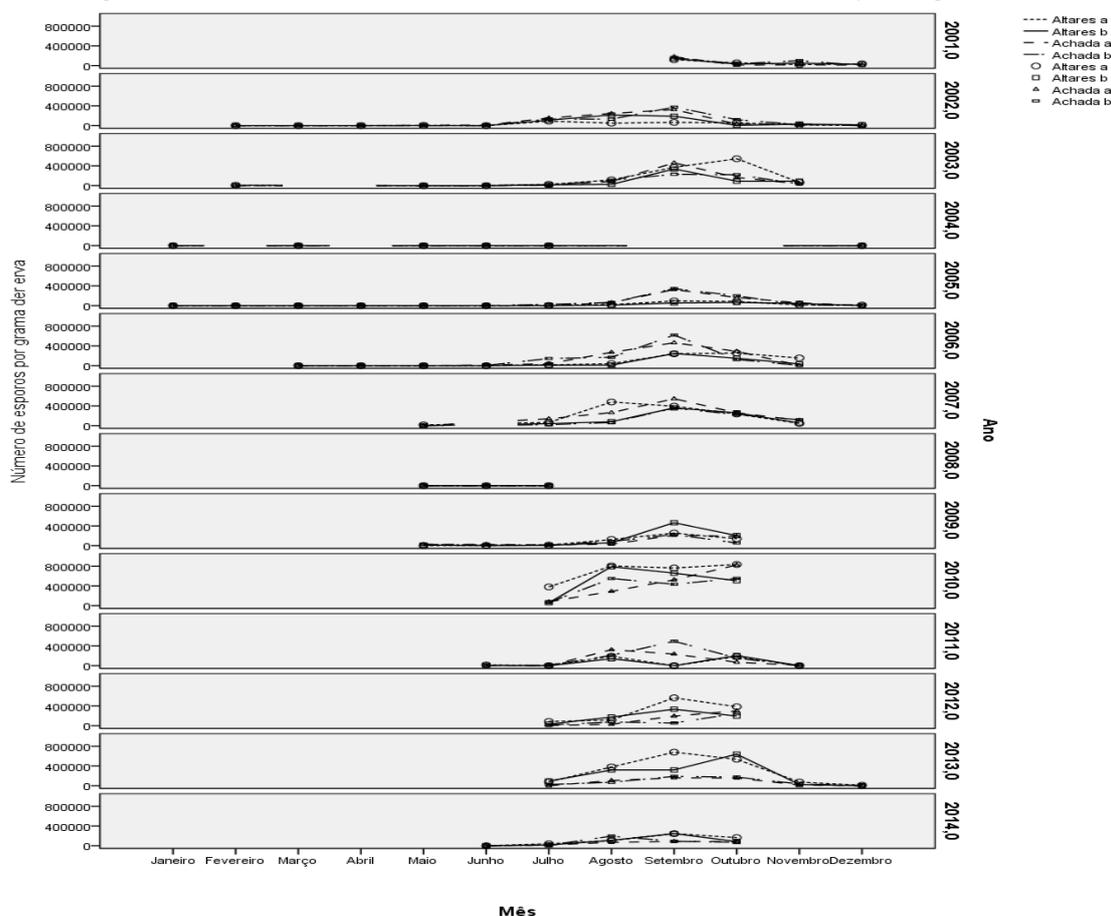


Gráfico 12: Contagem máxima de esporos das pastagens em cada mês, de quatro locais da Ilha Terceira, referentes aos anos entre 2001 e 2014.

O número de consultas realizadas a animais com fotossensibilidade pela equipa de médicos veterinários da UNICOL e o número de casos de animais que entraram no matadouro da Ilha Terceira com FTS, entre o ano de 2004 e 2014, estão presentes no Gráfico 13. No ano 2004 apenas foi possível a recolha do registo das consultas realizadas pela equipa veterinária da UNICOL. Em 2004, o registo máximo de consultas verificou-se em Setembro, com 19 chamadas. No ano 2005, registou-se a entrada máxima no matadouro de cinco animais com fotossensibilidade em Janeiro e um número de seis consultas em Setembro. Em 2006, verificaram-se 21 consultas realizadas a animais fotossensíveis durante o mês de Setembro e a entrada de sete animais no matadouro em Novembro. No ano de 2007, o número máximo de consultas e o mês em que ocorreram foi idêntico ao ano anterior e o número de animais que entraram com fotossensibilidade no matadouro foi de 11, em Maio. Em 2008, entrou um número

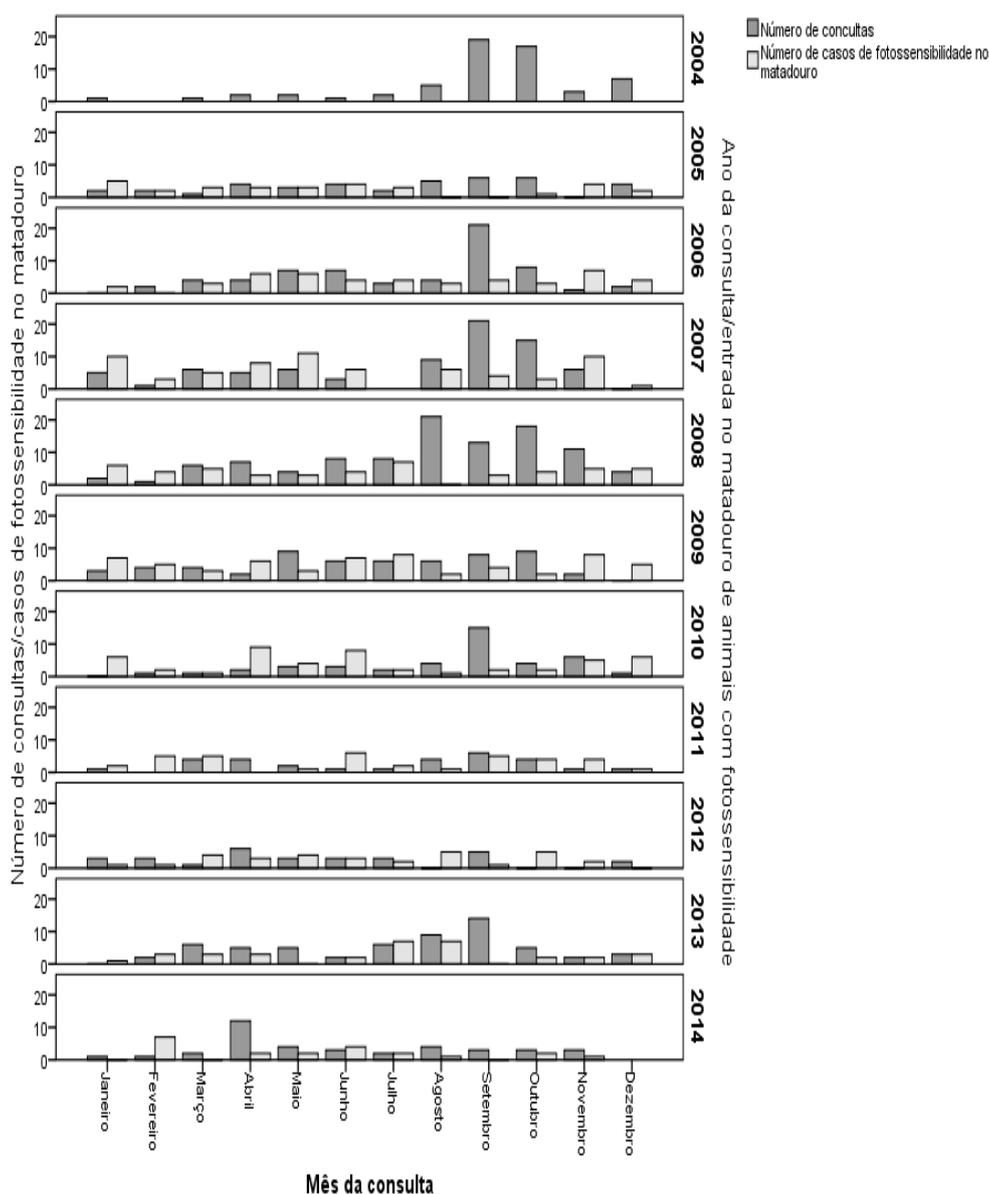


Gráfico 13: Distribuição do número de consultas realizadas a animais com FTS pela equipa veterinária da UNICOL e número de casos no matadouro da Ilha Terceira com FTS, entre o ano de 2004 e 2014, e entre 2005 e 2014, respetivamente.

máximo de sete animais com fotossensibilidade no matadouro no mês de Julho e foram realizadas 21 consultas em Agosto. No ano de 2009, o número máximo de consultas registou-se em Maio e Outubro com 9 chamadas e os casos de fotossensibilidade no matadouro foram máximos nos meses de Julho e Novembro com oito casos. Em 2010, foram realizadas um máximo de 15 consultas durante o mês de Setembro, entrando um número excelso de nove animais com fotossensibilidade no matadouro em Abril. No ano de 2011, o número máximo de consultas e de entradas de animais com fotossensibilidade no matadouro foi de seis, em Setembro e Junho, respetivamente. Em 2012, um máximo de seis consultas em Abril e de cinco casos de fotossensibilidade no matadouro em Agosto, foi o registado. No ano de 2013, um máximo de sete casos de fotossensibilidade deram entrada no matadouro, em Julho e Agosto, tendo o máximo de consultas ocorrido em Setembro com 14 chamadas. Em 2014, o número máximo de animais com fotossensibilidade à entrada no matadouro foi idêntico ao ano anterior, desta feita ocorrido em Fevereiro, quanto ao número de consultas, este apresentou um máximo de 12 em Abril.

## 4.2. Estudo no matadouro

### 4.2.1. Ilha de S. Miguel

A amostra observada no matadouro da Ilha S. Miguel compreende as carcaças de 1331 indivíduos ( $n=1331$ ), da espécie bovina, todos eles pertencentes à categoria de animais E (carcaças de fêmeas que já tenham parido). Os indivíduos amostrados apresentam idades

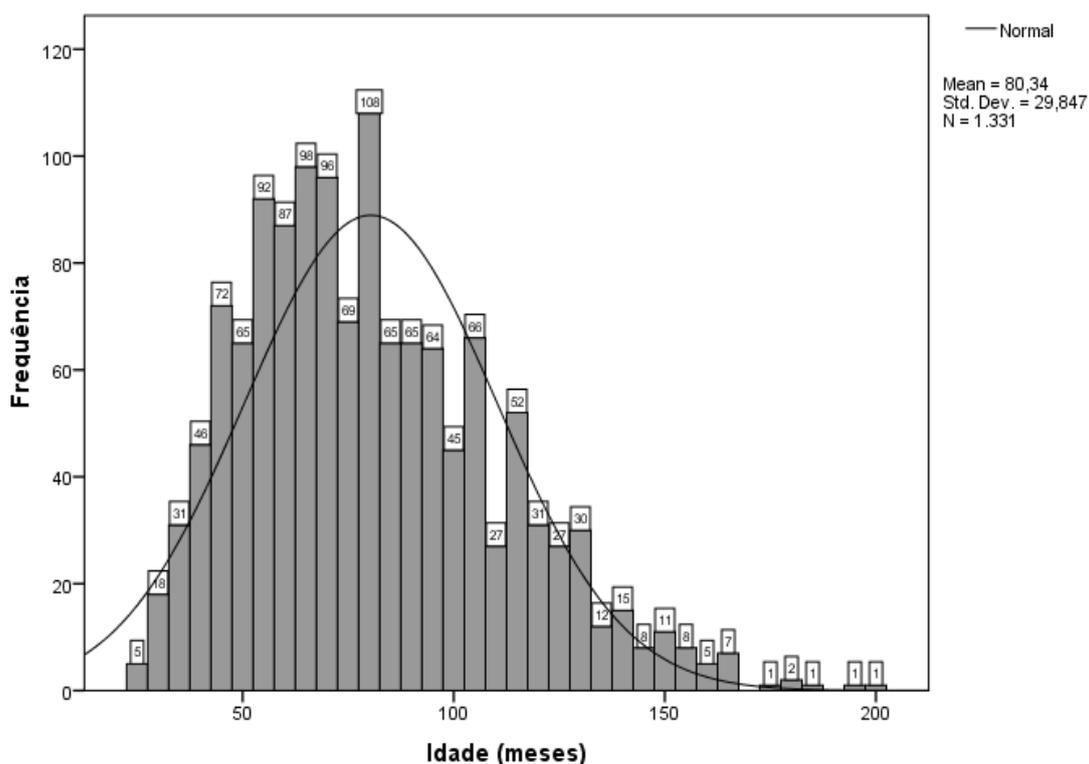


Gráfico 14: Histograma com a distribuição das idades da amostra e a sobreposição da distribuição de Gauss.

compreendidas entre os 25 e os 200 meses, sendo o valor médio da sua idade  $80,34 \pm 29,847$  meses ( $\bar{x}=80,34$ ;  $s=29,847$ ). A idade mais frequente é de 67 meses (valor mais baixo das várias modas, indicado pelo *Statistical Package for the Social Sciences – SPSS*), tendo 25% da amostra menos de 58 meses, 50% menos de 77 meses e 75% menos de 100 meses. A amostra, relativamente à idade, apresenta enviesamento positivo ou assimetria à direita (Coeficiente de enviesamento ou *Skewness*= $g1=0,681 \Leftrightarrow g1>0$ ) e tem uma distribuição leptocúrtica (Coeficiente de achatamento ou de kurtose= $g2=0,205 \Leftrightarrow g2>0$ ). A idade da amostra não tem uma distribuição normal ou de Gauss, pois além de  $g1 \notin ]-0,5;0,5[$ , também o teste à normalidade de Kolmogorov-Smirnov (K-S), com correção de Lilliefors apresenta um nível de significância de 0,000, o qual é menor do que 0,05, rejeitando-se, por isso, a hipótese da idade da amostra seguir uma distribuição normal. Mesmo com a logaritmização da idade a distribuição não normaliza (Gráfico 14). Na Tabela 20 são apresentados os subgrupos estudados da amostra, com o número de animais que cada contém, a média das idades e o desvio padrão em meses.

**Tabela 20: Médias e desvios padrão das idades (meses) dos subgrupos estudados**

<b>Subgrupo de animais</b>	<b>Número de animais (n)</b>	<b>Média das idades (meses)</b>	<b>Desvio padrão das idades (meses)</b>
Amostra	1331	80,34	29,847
C/ F/E hepática	598	84,42	30,096
C/ F/E hepática compatível c/ pitomicototoxicose	311	86,49	29,817
C/ F/E hepática grau I e compatível c/ pitomicototoxicose	115	79,83	26,306
C/ F/E hepática grau II e compatível c/ pitomicototoxicose	96	89,04	30,311
C/ F/E hepática grau III e compatível c/ pitomicototoxicose	76	93,24	32,362
C/ F/E hepática grau IV e compatível c/ pitomicototoxicose	24	86,83	30,721

À inspeção *ante mortem*, 94,29% (1255 animais) dos animais não mostrou alterações, apenas 3,01% (40 animais) apresentou caquexia, 0,83% alterações musco esqueléticas ou alterações da glândula mamária (11 animais cada alteração). A HPQ apareceu em 0,23% (três animais) dos animais (Gráfico 15).

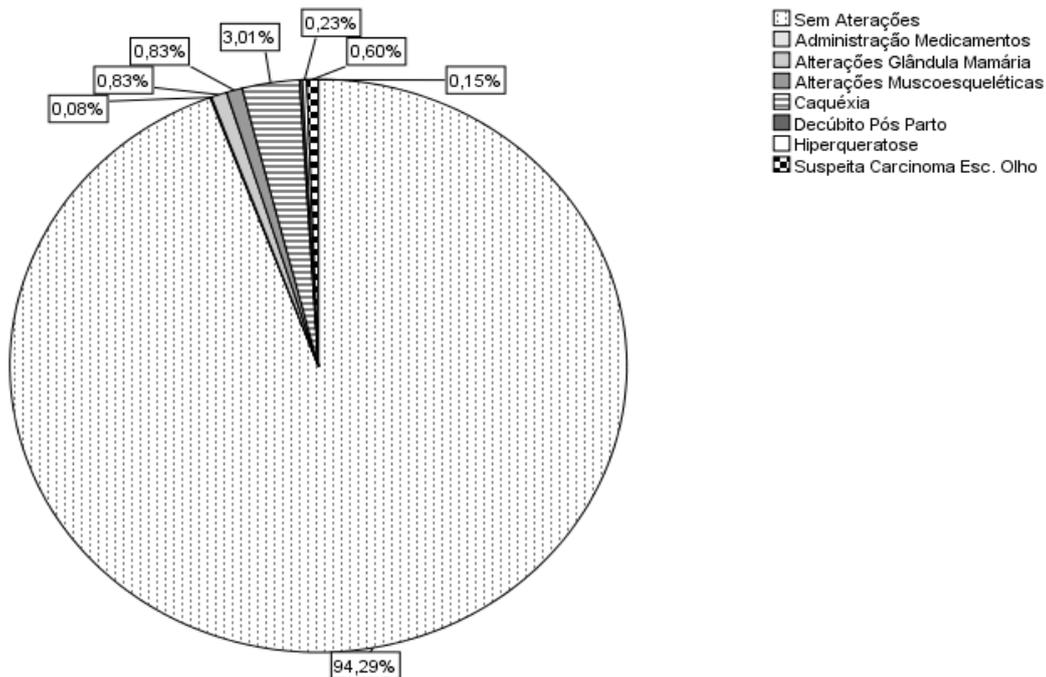


Gráfico 15: Distribuição, em percentagem, das alterações na inspeção *ante mortem*.

Os pesos das carcaças quentes da amostra variam entre 131 e 438 Kg, sendo o valor médio dos pesos das carcaças quentes de  $261,34 \pm 49,491$  Kg ( $\bar{x}=261,34$ ;  $s=49,491$ ). O peso de carcaça quente mais frequente é de 262 Kg, tendo 25% da amostra menos de 227 Kg, 50% menos de 257 Kg meses e 75% menos de 292 Kg. A amostra, relativamente ao peso da carcaça quente, apresenta enviesamento positivo ou assimetria à direita (Coeficiente de enviesamento ou Skewness= $g_1=0,430 \Leftrightarrow g_1 > 0$ ) e tem uma distribuição leptocúrtica (Coeficiente de achatamento ou de kurtose= $g_2=0,119 \Leftrightarrow g_2 > 0$ ). O peso carcaça quente não tem uma distribuição normal ou de Gauss pois o teste à normalidade K-S, com correção de Lilliefors apresenta um nível de significância de 0,000, o qual é menor do que 0,05, rejeitando-se, por isso, a hipótese de que o peso da carcaça quente segue uma distribuição normal. Contudo,  $g_1 \wedge g_2 \in ]-0,5; 0,5[$  e ao logaritmizar o peso da carcaça quente a função  $\log_{10}(\text{peso da carcaça quente})$  tem uma distribuição normal, pois o nível de significância dos testes à normalidade K-S, com correção de Lilliefors sobe para 0,2 (Gráfico 16). Na Tabela 21 são apresentados os subgrupos estudados da amostra, com o número de animais que cada contém, a média dos pesos e o desvio padrão em kilogramas.

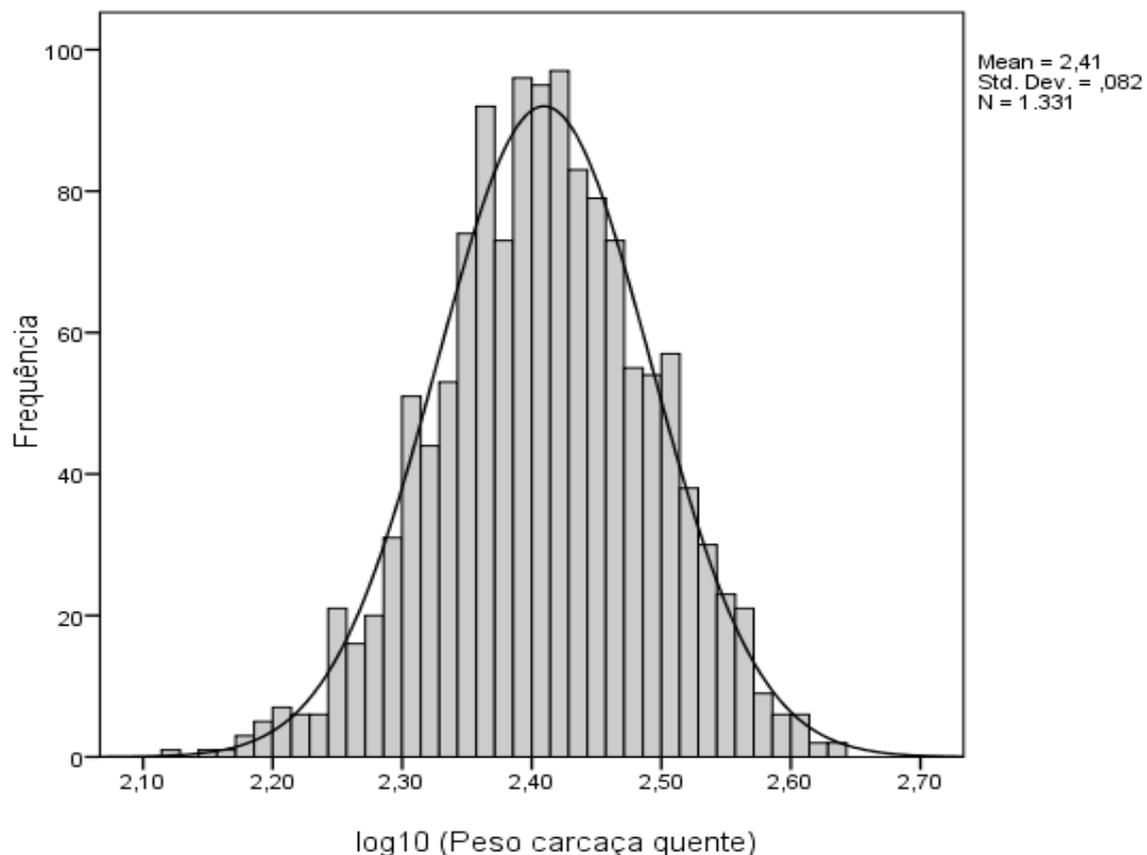


Gráfico 16: Histograma com a distribuição do log<sub>10</sub> (Peso da carcaça quente) com sobreposição da distribuição de Gauss.

Tabela 21: Médias e desvios padrão dos pesos (Kg) dos subgrupos estudados

Subgrupo de animais	Número de animais (n)	Média dos pesos (Kg)	Desvio padrão dos pesos (Kg)
Amostra	1331	261,34	49,491
C/ F/E hepática	598	257,44	47,428
C/ F/E hepática compatível c/ pitomicotoxicose	311	255,76	48,263
C/ F/E hepática grau I e compatível c/ pitomicotoxicose	115	262,89	49,16
C/ F/E hepática grau II e compatível c/ pitomicotoxicose	96	257,93	50,147
C/ F/E hepática grau III e compatível c/ pitomicotoxicose	76	248,80	45,734
C/ F/E hepática grau IV e compatível c/ pitomicotoxicose	24	234,92	36,377

A avaliação das carcaças quanto à sua conformação muscular é apresentada no Gráfico 17. Cerca de 36% (36,36% - 484 carcaças) das carcaças avaliadas foi incluída na classe medíocre, seguida da classe razoável (16,75% - 223 carcaças) e da classe medíocre superior (14,2% - 188 carcaças).

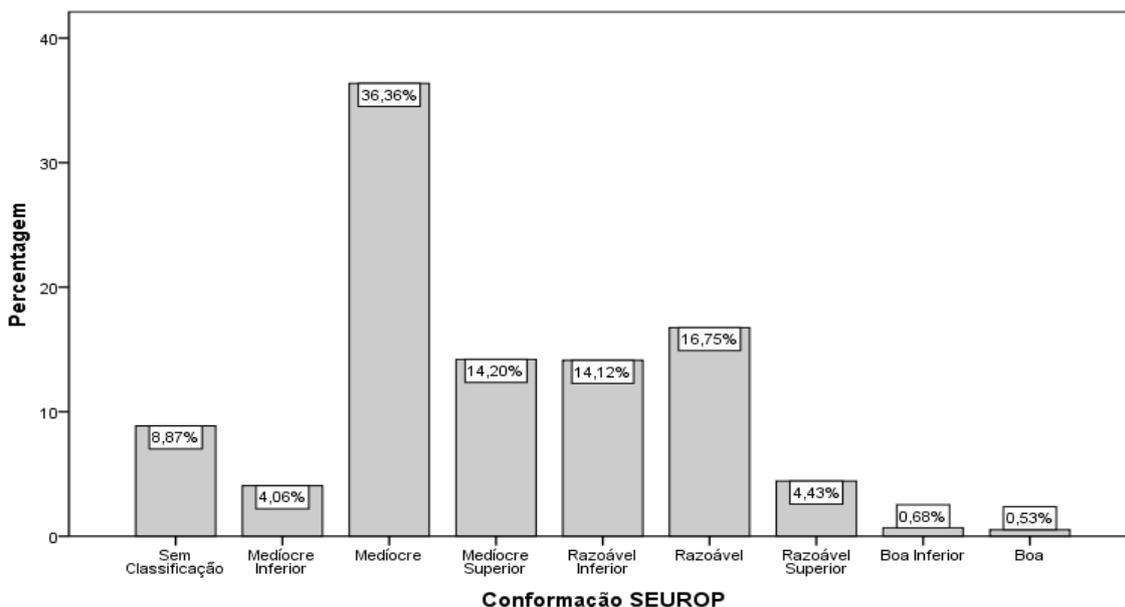


Gráfico 17: Distribuição, em percentagem, da conformação SEUROP das carcaças observadas.

A classificação das carcaças quanto à gordura é apresentada no Gráfico 18. Cerca de 28,85% (384 carcaças) das carcaças observadas apresentaram gordura reduzida, 13,37% (178 carcaças) gordura média e 12,70% (169 carcaças) gordura muito reduzida.

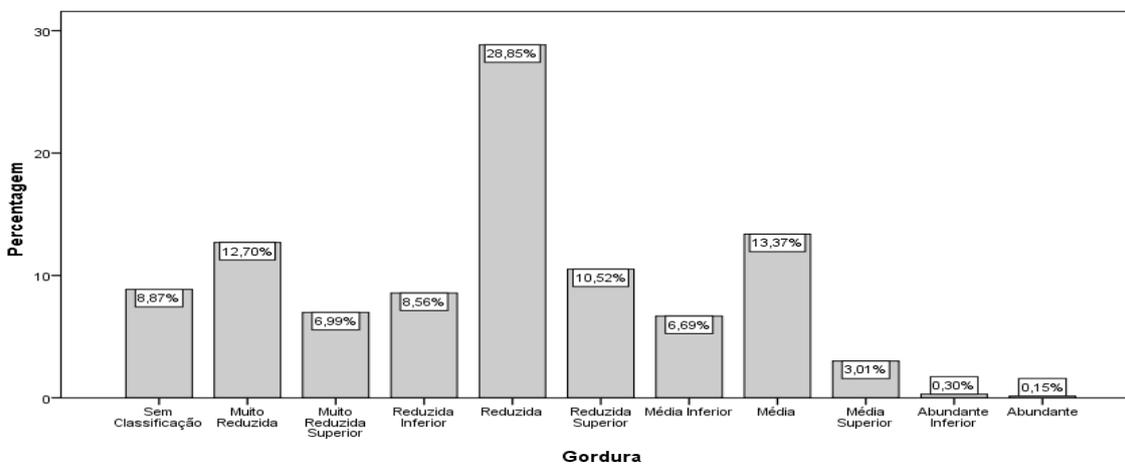


Gráfico 18: Distribuição, em percentagem, da gordura da carcaça.

Os resultados percentuais da avaliação das carcaças observadas são apresentados no Gráfico 19. Das 1331 carcaças avaliadas, 77,46% (1031 carcaças) foram aprovadas, 12,92% (172 carcaças) permaneceram sob observação, 8,79% (117 carcaças) foram reprovadas e 0,83% (11 carcaças) foram aprovadas parcialmente. A Tabela 22 apresenta as taxas de reprovação e aprovação das carcaças de cada subgrupo.

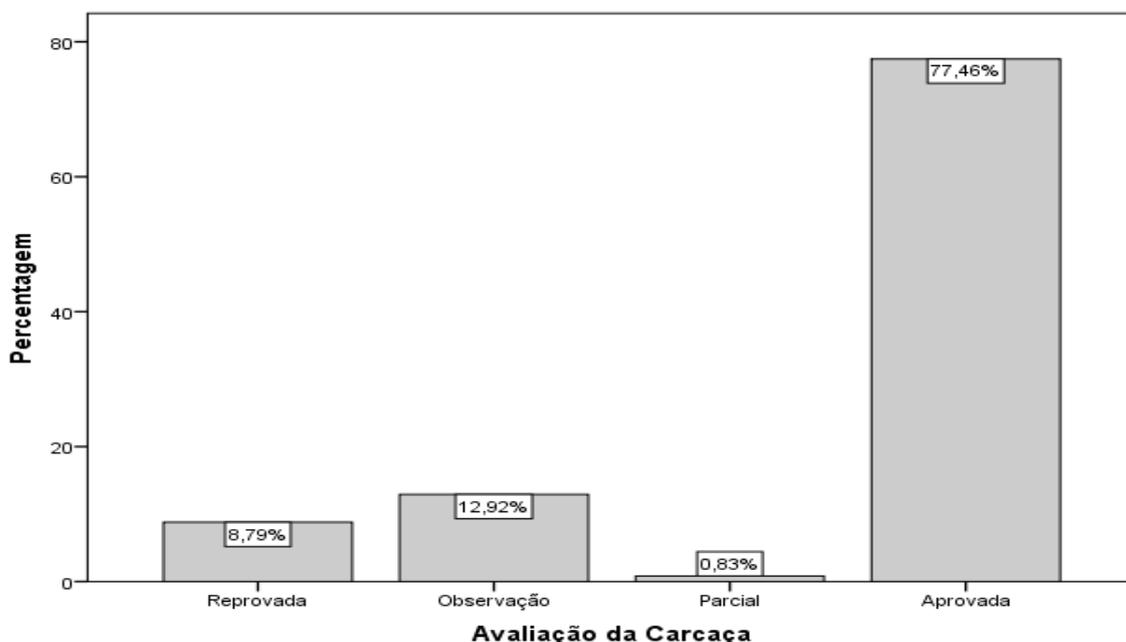


Gráfico 19: Resultados da inspeção das rejeição das carcaças e suas frequências relativas.

Tabela 22: Taxa de aprovação e reprovação das carcaças dos subgrupos estudados e principal causa de rejeição de carcaças em cada subgrupo

Subgrupo de animais	N.ºde animais (n)	Taxa de rejeição das carcaças	Taxa de aprovação das carcaças	Causa mais frequente de rejeição
Amostra	1331	117 (8,79%)	1031 (77,46%)	Neoplasia da bexiga (37,61%)
C/ F/E hepática	598	43 (7,19%)	462 (77,26%)	Neoplasia da bexiga (44,2%)
C/ F/E hepática compatível c/ pitomicotoxicose	311	30 (9,65%)	225 (72,35%)	Neoplasia da bexiga (46,7%)
C/ F/E hepática grau I e compatível c/ pitomicotoxicose	115	7 (6,09%)	88 (76,52%)	Anemia/caquexia/emaciação (42,9%)
C/ F/E hepática grau II e compatível c/ pitomicotoxicose	96	5 (5,21%)	72 (75%)	Anemia/caquexia/emaciação (60%)
C/ F/E hepática grau III e compatível c/ pitomicotoxicose	76	13 (17,11%)	48 (63,16%)	Neoplasia da bexiga (69,2%)
C/ F/E hepática grau IV e compatível c/ pitomicotoxicose	24	5 (20,83%)	17 (70,83%)	Neoplasia da bexiga (60%)

As causas de rejeição das carcaças e percentagem de frequência de cada causa são apresentadas no Gráfico 20. Das 117 carcaças rejeitadas, 37,61% (44 carcaças) foram rejeitadas por neoplasia da bexiga, 29,06% (34 carcaças) por anemia, caquexia e emaciação e 7,69% (nove carcaças) por causas não descritas. A Tabela 22 apresenta a causa de rejeição da carcaça mais frequente em cada subgrupo.

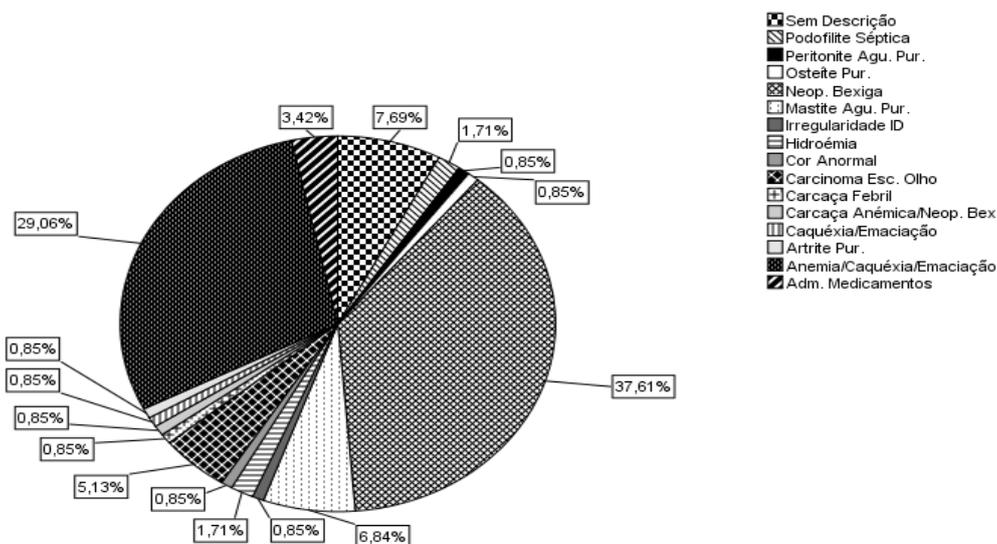


Gráfico 20: Distribuição, em percentagem, das diversas classificações e causas resultantes da avaliação das carcaças.

Os resultados da inspeção das vísceras (fígado, pulmão, coração, rins, diafragma, língua e rabo) são apresentados no Gráfico 21. Todas as vísceras tiveram 8,87% (118 fígados, pulmões, corações, diafragmas, línguas, rabos e 236 rins) de rejeição devido a rejeição total da carcaça. Dos 1331 fígados, 88,88% (1183 fígados) foram rejeitados após inspeção *post mortem* da víscera, enquanto a aprovação total abrangiu 0,15% (dois fígados) e a parcial 2,1% (28 fígados) dos fígados. Quanto ao pulmão, 75,28% (1002 pulmões) destas vísceras foram rejeitadas após inspeção e 15,85% (211 pulmões) foram aprovadas. Dos corações inspecionados, 6,31% (84 corações) foram rejeitados no *post mortem* e 84,82% (1129 corações) foram aprovados.

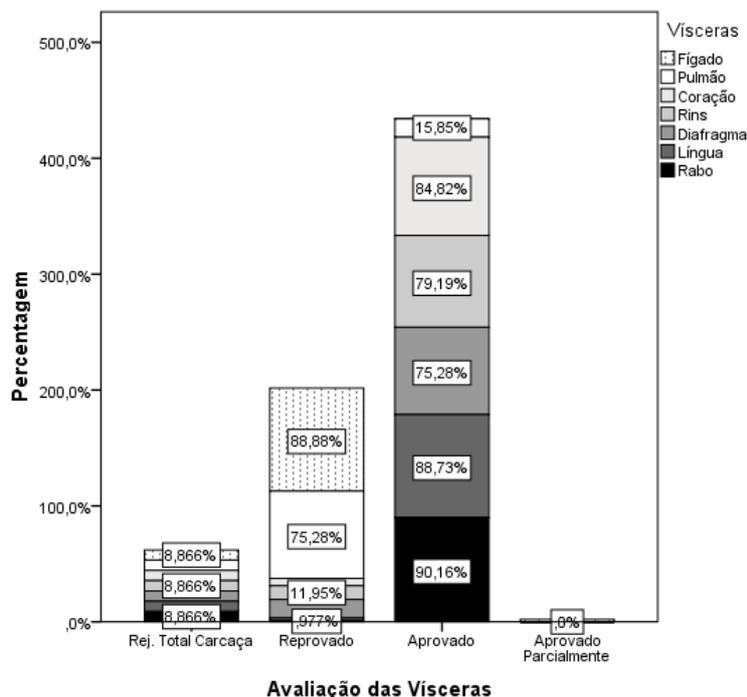


Gráfico 21: Distribuição percentual da avaliação das vísceras (fígado, pulmão, coração, rins, diafragma, língua e rabo) após inspeção sanitária.

Quase 12% (11,95% - 159 pares de rins) dos rins foram reprovados após inspeção e aprovados 79,19% (1054 pares de rins). Quanto ao diafragma, 15,85% (211 diafragmas) teve rejeição *post mortem* e 75,28% (1002 diafragmas) aprovação. A língua contou com 2,4% (32 línguas) de reprovação e 88,73% (1181 línguas) de aprovação. Por fim, o rabo teve uma taxa de reprovação de 0,98% (13 rabos) no *post mortem* e uma taxa de aprovação de 90,16% (1200 rabos).

As causas de rejeição hepática indicadas pelo matadouro são apresentadas no Gráfico 22. Dos 1301 fígados rejeitados, 26,44% (344 fígados) foram rejeitados pela presença de telangiectasia, 24,75% (322 fígados) por F/E e 17,14% (223 fígados) por parasitose. Ainda que a causa de rejeição hepática indicada pelo matadouro seja só uma, 47,26% (629 fígados) dos fígados apresentava telangiectasia, 44,93% (598 fígados) F/E, 33,88% (451 fígados) parasitose, 23,4% (312 fígados) aderências, 4,88% (65 fígados) esteatose, 4,81% (64 fígados) abscessos, 4,13% (55 fígados) fasciolose e 0,68% (9 fígados) petéquias.

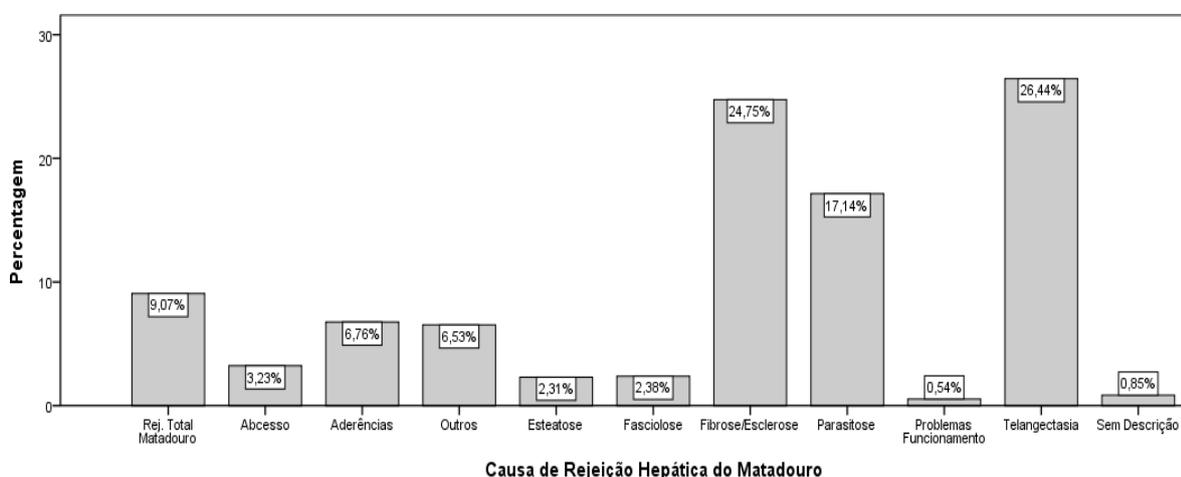


Gráfico 22: Distribuição, em percentagem, das causas de rejeição hepática indicada pelo matadouro.

Dos 1331 fígados observados, 55,07% (733 fígados) não apresentavam F/E, 24,79% (330 fígados) apresentaram grau ligeiro, 11,42% (152 fígados) grau moderado, 6,91% (92 fígados) grau intenso e 1,8% (24 fígados) grau severo de F/E, num total de 44,93% (598 fígados) com F/E (Gráfico 23). Dos 598 fígados com F/E, 52,01% (311 fígados) apresentavam lesões de F/E compatíveis com pitomicototoxicose, dos quais 36,98% (115 fígados) com grau ligeiro, 30,87% (96 fígados) com grau moderado, 24,44% (76 fígados) com grau intenso, 7,72% (24 fígados) com grau severo de F/E. Em 1331 fígados observados, 311 (23,37%) apresentavam lesões compatíveis com pitomicototoxicose.

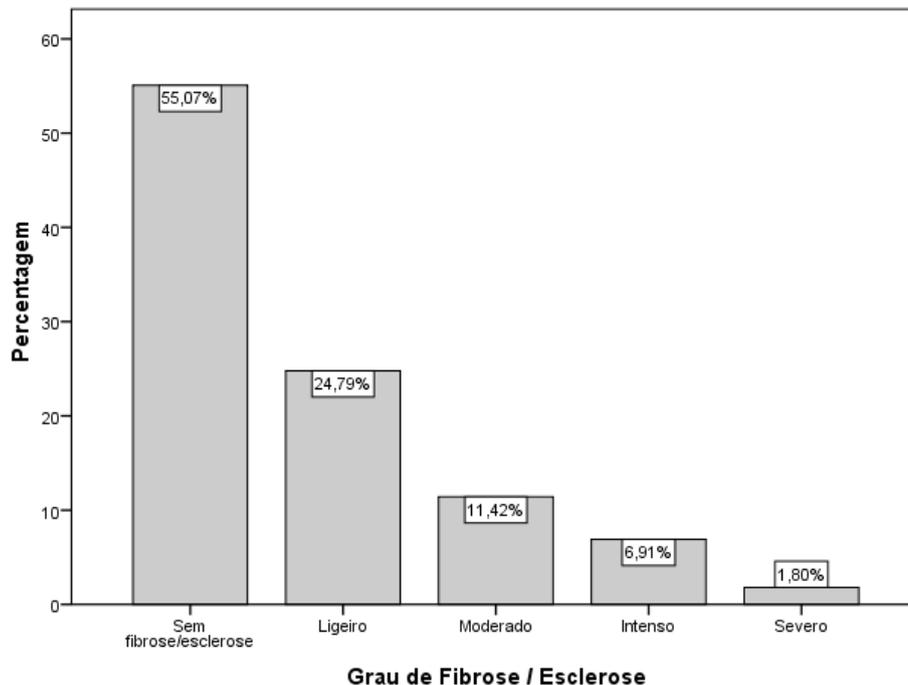


Gráfico 23: Distribuição, em percentagem, dos fígados sem F/E e dos graus de F/E apresentados pelos restantes fígados.

#### 4.2.2. Ilha Terceira

A amostra observada no matadouro da Ilha Terceira compreende as carcaças de 410 indivíduos ( $n=410$ ), da espécie bovina, todos eles pertencentes à categoria de animais E (carcaças de fêmeas que já tenham parido). Os indivíduos apresentam idades compreendidas entre os 22 e os 193 meses, sendo o valor médio da idade dos indivíduos amostrados  $81,28 \pm 32,551$  meses ( $\bar{x}=81,28$ ;  $s=32,551$ ). A idade mais frequente dos indivíduos é de 72 meses (valor mais baixo das várias modas, indicado pelo SPSS), tendo 25% da amostra menos de 58 meses, 50% menos de 75 meses e 75% menos de 100,5 meses.

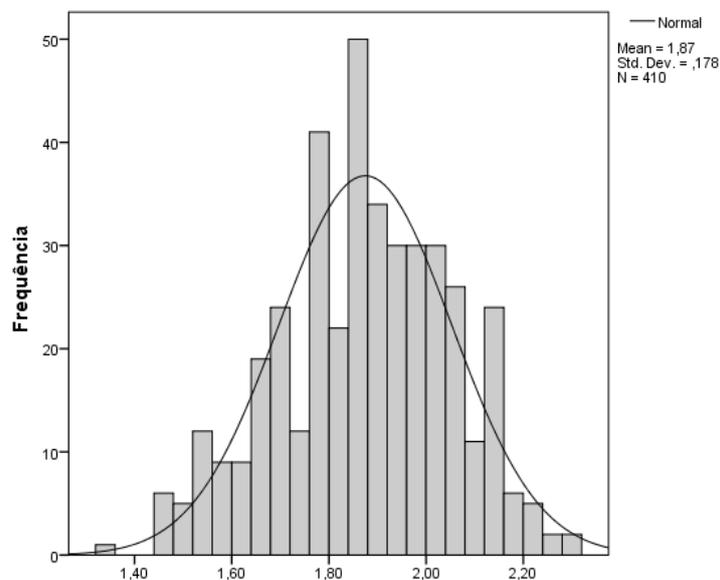


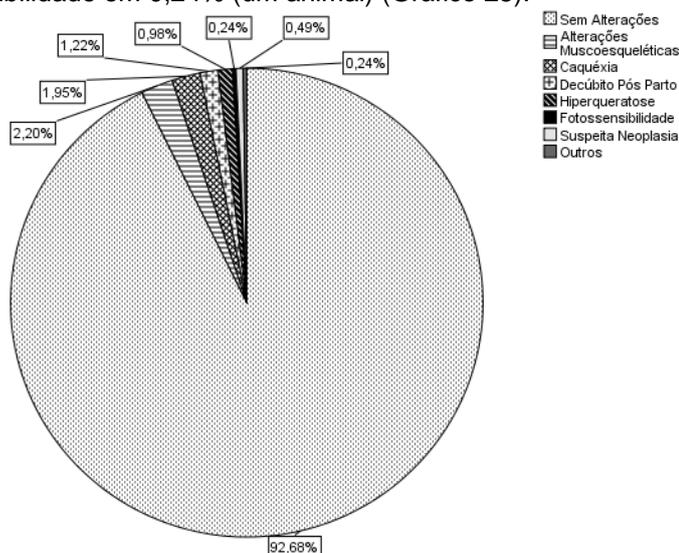
Gráfico 24: Distribuição logaritimizada da idade, com sobreposição da distribuição de Gauss.

A amostra, relativamente à idade, apresenta enviesamento positivo ou assimetria à direita (Coeficiente de enviesamento ou  $Skewness=g1=0,744 \Leftrightarrow g1>0$ ) e tem uma distribuição leptocúrtica (Coeficiente de achatamento ou de kurtose= $g2=0,350 \Leftrightarrow g2>0$ ). A idade da amostra não tem uma distribuição de Gauss, pois além de  $g1 \notin ]-0,5;0,5[$ , também o teste à normalidade de K - S, com correção de Lilliefors apresenta um nível de significância de 0,000, o qual é menor do que 0,05, rejeitando-se, por isso, a hipótese da idade da amostra seguir uma distribuição normal. Com a logaritmização da idade a distribuição normaliza, pois o teste à normalidade de K-S com correção de Lilliefors apresenta um nível de significância de 0,062, o qual é maior do que 0,05, aceitando-se a normalidade da amostra (Gráfico 24). Na Tabela 23 são apresentados subgrupos estudados da amostra, com o número de animais que cada contém, a média das idades e o desvio padrão em meses.

**Tabela 23: Médias e desvios padrão das idades (meses) dos subgrupos estudados**

Subgrupo de animais	Número de animais (n)	Média das idades (meses)	Desvio padrão das idades (meses)
Amostra	410	81,28	32,551
C/ F/E hepática	212	89,52	33,179
C/ F/E hepática compatível c/ pitomicotóxico	121	93,16	29,741
C/ F/E hepática grau I e compatível c/ pitomicotóxico	56	90,70	31,159
C/ F/E hepática grau II e compatível c/ pitomicotóxico	42	95,67	28,237
C/ F/E hepática grau III e compatível c/ pitomicotóxico	19	96,11	31,186
C/ F/E hepática grau IV e compatível c/ pitomicotóxico	4	87,25	23,372

À inspeção *ante mortem*, 92,68% (380 animais) dos animais não mostrou alterações, apenas 2,2% (9 animais) apresentou alterações musculares, 1,95% (oito animais) caquexia e 0,49% decúbito pós parto (dois animais). A hiperqueratose apareceu em 0,98% (quatro animais) dos animais e a fotossensibilidade em 0,24% (um animal) (Gráfico 25).



**Gráfico 25: Distribuição, em percentagem, das alterações na inspeção *ante mortem*.**

Os pesos das carcaças quentes da amostra variam entre 160 e 393 Kg, sendo o valor médio dos pesos das carcaças quentes de 259,09±42,418 Kg ( $\bar{x}$ =259,09;  $s$ =42,418). O peso de carcaça quente mais frequente é de 232 Kg, tendo 25% da amostra menos de 229 Kg, 50% menos de 256 Kg meses e 75% menos de 287,25 Kg. A amostra, relativamente ao peso da carcaça quente, apresenta enviesamento positivo ou assimetria à direita (Coeficiente de enviesamento ou Skewness= $g_1$ =0,310 $\Leftrightarrow g_1 > 0$ ) e tem uma distribuição leptocúrtica (Coeficiente de achatamento ou de kurtose= $g_2$ =-0,033 $\Leftrightarrow g_2 > 0$ ). O peso da carcaça quente não tem uma distribuição de Gauss pois o teste à normalidade de K-S, com correção de Lilliefors apresenta um nível de significância de 0,021, sendo o valor menor do que 0,05, rejeitando-se, por isso, a hipótese de que o peso da carcaça quente segue uma distribuição normal. Contudo,  $g_1 \wedge g_2 \in ]-0,5; 0,5[$  e ao logaritizar o peso da carcaça quente a função  $\log_{10}(\text{peso da carcaça quente})$  tem uma distribuição de Gauss, pois o nível de significância do teste à normalidade de K-S, com correção de Lilliefors é maior do que 0,05, tendo um valor de 0,181 (Gráfico 26). Na Tabela 24 são apresentados os subgrupos estudados da amostra, com o número de animais que cada contém, a média dos pesos e o desvio padrão em kilogramas.

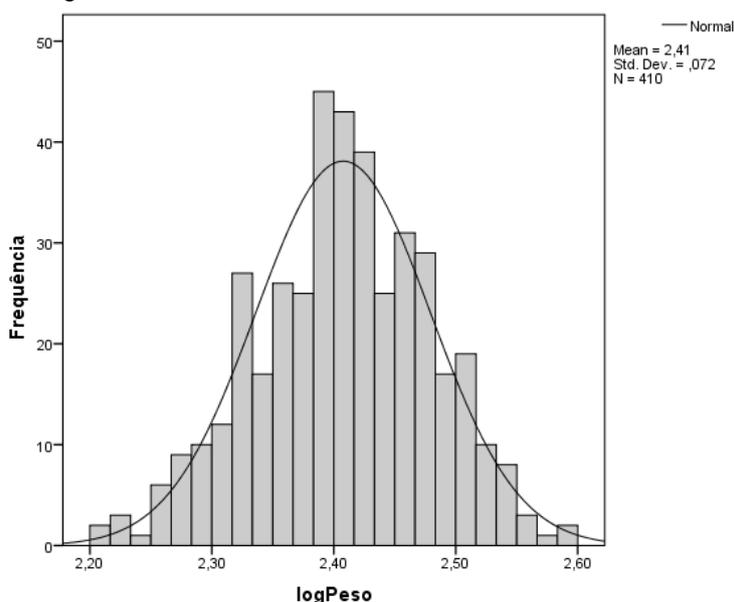


Gráfico 26: Histograma com a distribuição do  $\log_{10}$  (Peso da carcaça quente) com sobreposição da distribuição de Gauss.

Tabela 24: Médias e desvios padrão dos pesos (Kg) dos subgrupos estudados

Subgrupo de animais	Número de animais (n)	Média dos pesos (Kg)	Desvio padrão dos pesos (Kg)
Amostra	410	259,09	42,418
C/ F/E hepática	212	260,02	40,770
C/ F/E hepática compatível c/ pitomicotxicose	121	256,86	42,331
C/ F/E hepática grau I e compatível c/ pitomicotxicose	56	260,54	40,477
C/ F/E hepática grau II e compatível c/ pitomicotxicose	42	261,91	46,386
C/ F/E hepática grau III e compatível c/ pitomicotxicose	19	241,47	37,828
C/ F/E hepática grau IV e compatível c/ pitomicotxicose	4	225,25	14,338

A avaliação das carcaças quanto à sua conformação muscular é apresentada no Gráfico 27. Cerca de 34% (34,15% - 140 carcaças) das carcaças avaliadas foi incluída na classe medíocre superior, seguida da classe medíocre (29,27% - 120 carcaças) e da classe razoável inferior (16,34% - 67 carcaças).

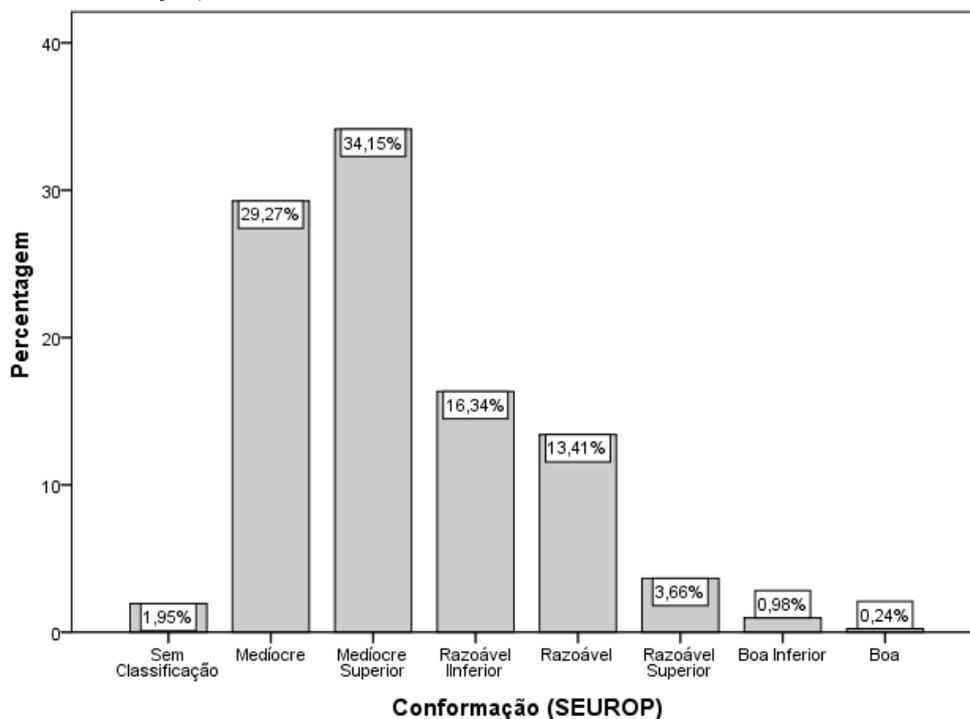


Gráfico 27: Distribuição, em percentagem, da conformação SEUROP das carcaças observadas.

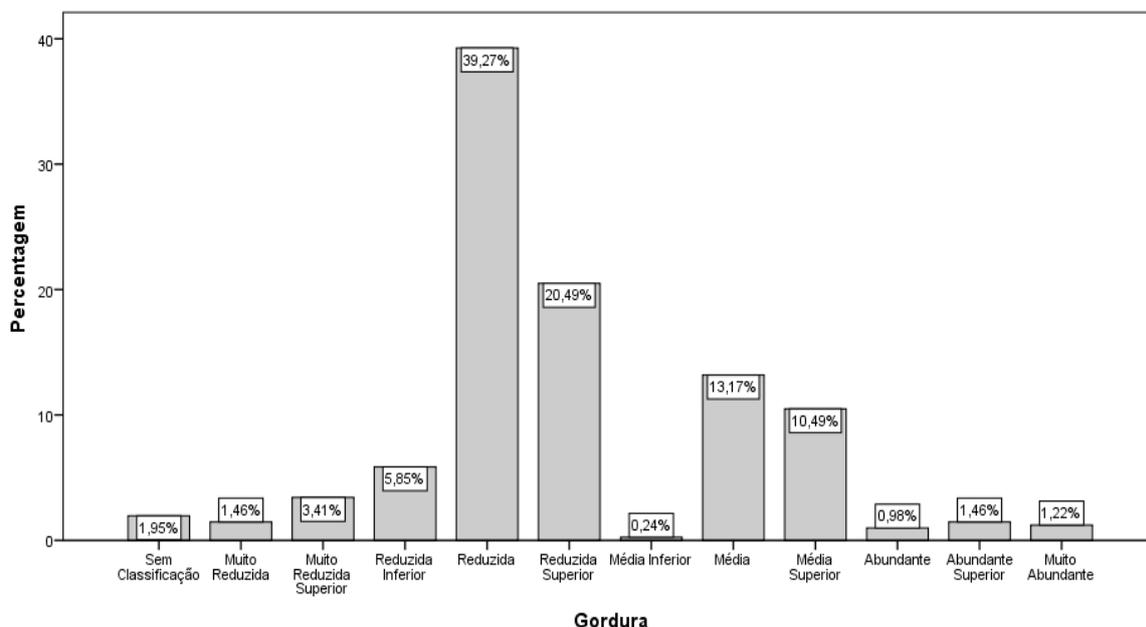


Gráfico 28: Distribuição, em percentagem, da gordura da carcaça.

A classificação das carcaças quanto à gordura é apresentada no Gráfico 28. Cerca de 39,27% (161 carcaças) das carcaças observadas apresentaram gordura reduzida 20,49% (84 carcaças) gordura reduzida superior e 13,17% (54 carcaças) gordura média.

Os resultados percentuais da avaliação das carcaças observadas são apresentados no Gráfico 29. Das 410 carcaças avaliadas, 89,02% (365 carcaças) foram aprovadas, 7,32% (30 carcaças) permaneceram sob observação e 3,66% (15 carcaças) foram reprovadas.

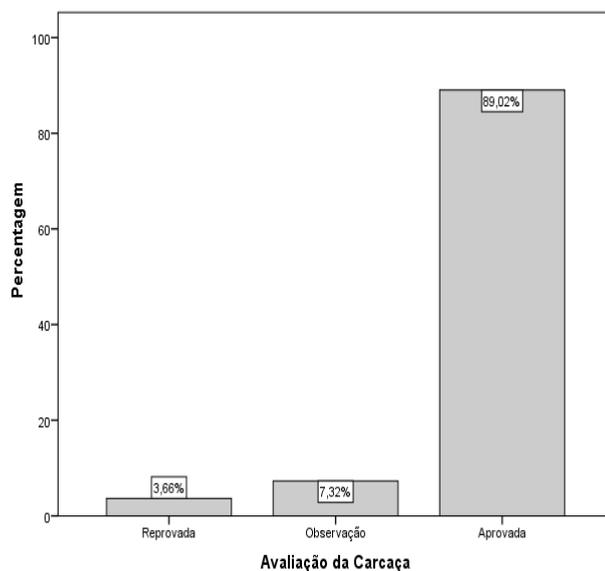


Gráfico 29: Distribuição, em percentagem, das diversas classificações resultantes da avaliação das carcaças.

As causas de rejeição das carcaças e percentagem de frequência de cada causa são apresentadas no Gráfico 30. Das 15 carcaças rejeitadas, 26,67% (quatro carcaças) foram rejeitadas por osteíte purulenta, 20,00% (três carcaças) por traumatismos extensos e 13,33% (duas carcaças) por anemia, caquexia e emaciação.

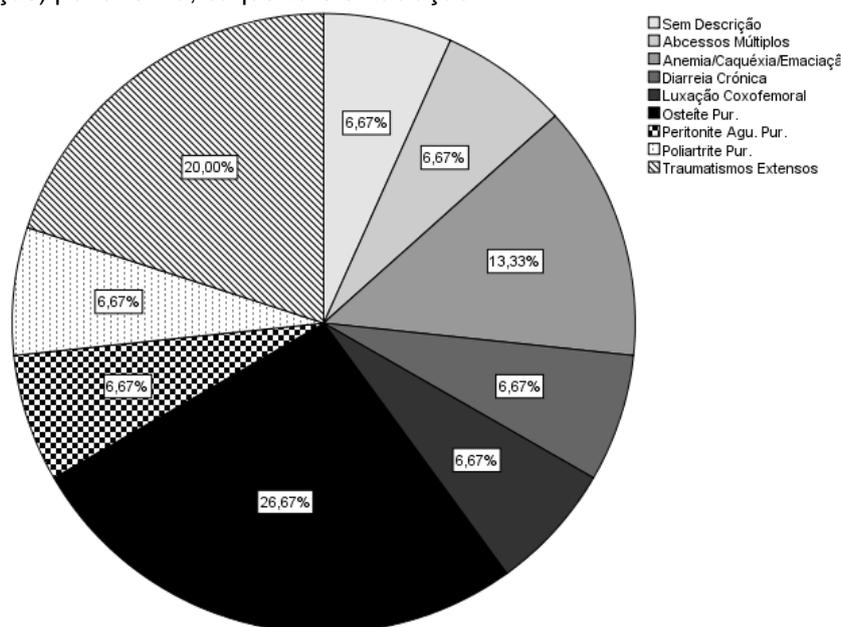


Gráfico 30: Causas de rejeição das carcaças e suas frequências relativas.

Os resultados da inspeção das vísceras (fígado, pulmão, coração, rins, diafragma, língua e rabo) são apresentados no Gráfico 31. Todas as vísceras tiveram 3,66% (15 fígados, pulmões, corações, diafragmas, línguas, rabos e 30 rins) de rejeição devido a rejeição total da carcaça. Dos 410 fígados, 65,37% (268 fígados) foram rejeitados após inspeção *post mortem* da víscera, enquanto a aprovação total abrangeu 19,51% (80 fígados) e a parcial 11,46% (47 fígados) dos fígados. Quanto ao pulmão, 91,95% (377 pulmões) destas vísceras foram rejeitadas após inspeção e 4,39% (18 pulmões) foram aprovadas. Dos corações inspecionados, 4,39% (18 corações) foram rejeitados no *post mortem* e 91,95% (377 corações) foram aprovados. Quase 1% (0,98% - quatro pares de rins) dos rins foram reprovados após inspeção e aprovados 95,37% (391 pares de rins). Quanto ao diafragma, 0,73% (três diafragmas) teve rejeição *post mortem* e 95,61% (392 diafragmas) aprovação. A língua contou com 0,49% (dois línguas) de reprovação e 95,85% (393 línguas) de aprovação. Por fim, o rabo teve uma taxa de reprovação de 4,15% (17 rabos) no *post mortem* e uma taxa de aprovação de 92,20% (378 rabos).

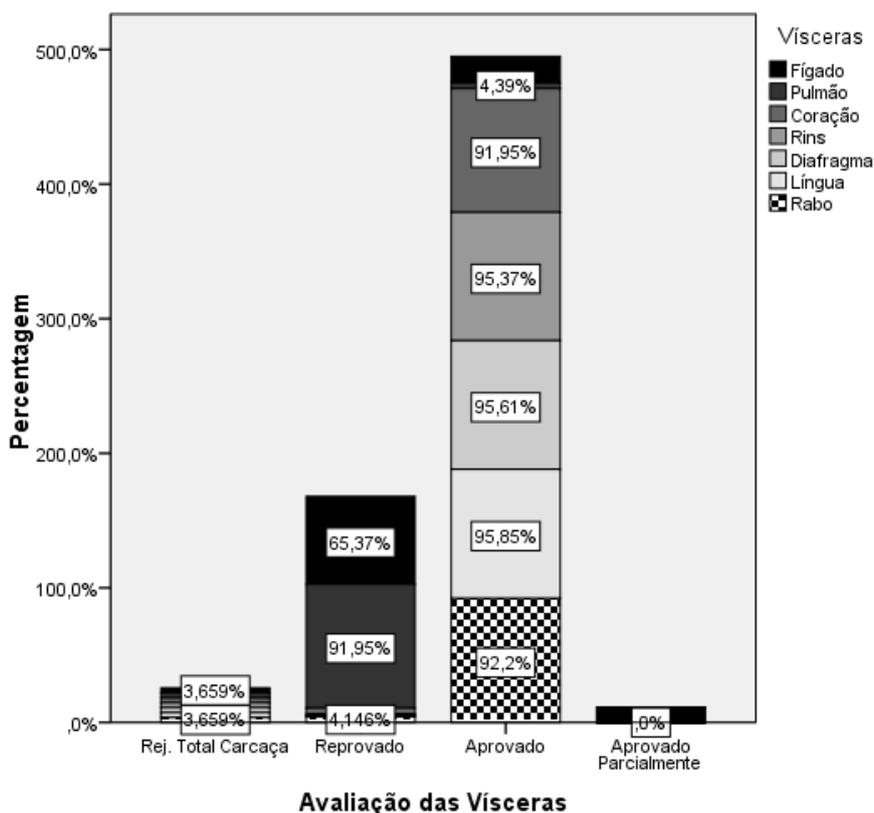


Gráfico 31: Distribuição percentual da avaliação das vísceras (fígado, pulmão, coração, rins, diafragma, língua e rabo) após inspeção sanitária.

As causas de rejeição hepática dos 283 fígados rejeitados, indicadas pelo matadouro, foram 24,03% (68 fígados) pela presença de telangiectasia, 23,32% (66 fígados) por F/E e 20,85% (59 fígados) por aderências (Gráfico 32). Ainda que a causa de rejeição hepática indicada pelo matadouro seja só uma, 67,1% (275 fígados) dos fígados apresentava aderências, 51,71% (212 fígados) F/E, 40,98% (168 fígados) telangiectasia, 38,05% (156 fígados) parasitose, 12,44% (51 fígados) abscessos e 1,71% (sete fígados) esteatose.

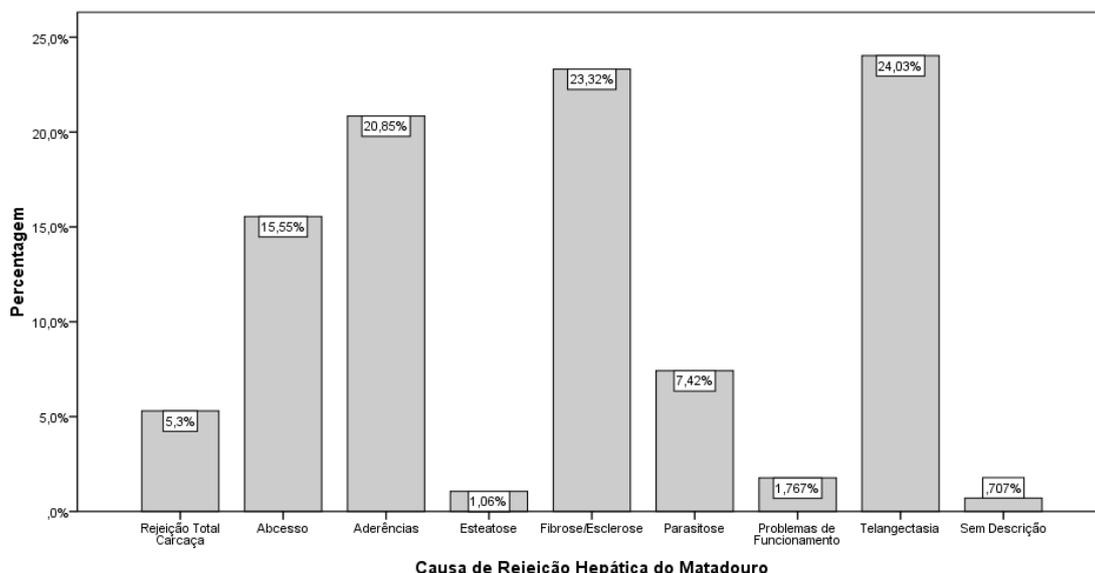


Gráfico 32: Distribuição, em percentagem, das causas de rejeição hepática indicada pelo matadouro.

Dos 410 fígados observados, 48,29% (198 fígados) não apresentavam F/E, enquanto os restantes 51,71% (212 fígados) apresentavam este tipo de lesões, dos quais 35,61% (146 fígados) com grau ligeiro, 10,49% (43 fígados) com grau moderado, 4,63% (19 fígados) com grau intenso e 1% (0,98% - quatro fígados) com grau severo de F/E (Gráfico 33). Dos 212 fígados com F/E, 57,08% (121 fígados) apresentavam lesões de F/E compatíveis com pitomicototoxicose, dos quais 46,28% (56 fígados) com grau ligeiro, 34,71% (42 fígados) com grau moderado, 15,7% (19 fígados) com grau intenso, 3,31% (quatro fígados) com grau severo de F/E.

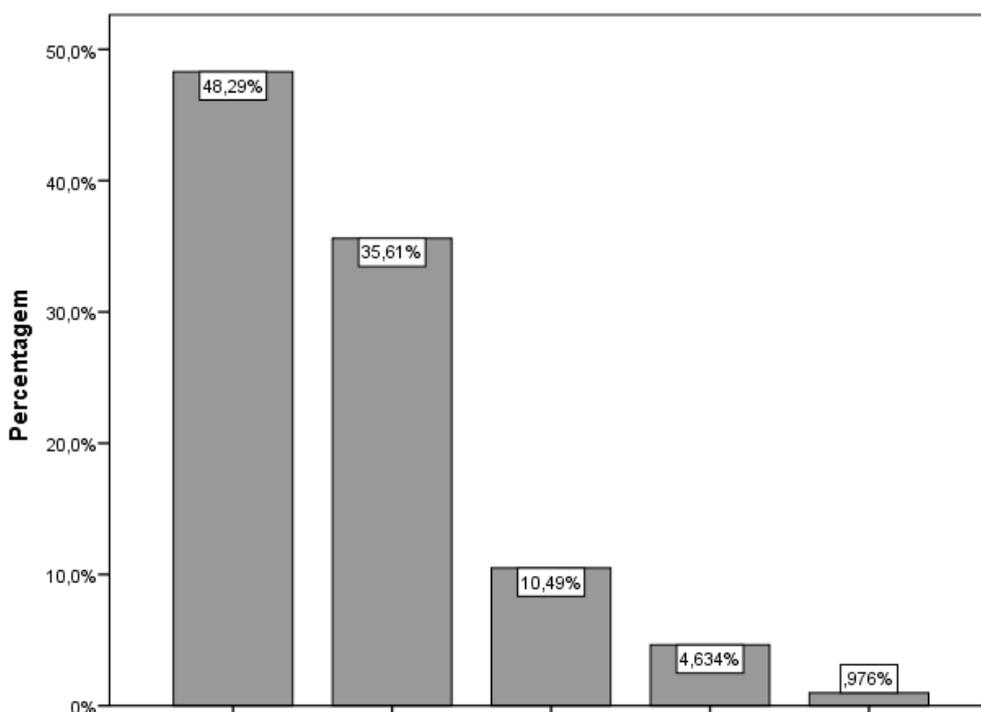


Gráfico 33: Distribuição, em percentagem, dos fígados sem F/E e dos graus de F/E apresentados pelos restantes fígados.

### 4.2.3. Análise histopatológica

Alguns fígados, exemplos dos vários graus de lesão hepática, foram sujeitos ao envio de amostras para o Laboratório Regional de Veterinária, departamento de Patologia, sediado na Ilha Terceira, local onde foi efetuada a análise histopatológica. Um resumo das alterações histopatológicas encontradas nas amostras é apresentado na Tabela 25.

Tabela 25: Graus de lesão hepática macroscópica e alterações histopatológicas respetivas.

<b>Grau de lesão</b>	<b>Alterações histopatológicas</b>
I (Figura 20, 21, 22, 23 e 24)	Aumento da espessura da cápsula de Glisson por deposição de tecido fibroso. Alguns hepatócitos apresentam tumefação, degenerescência hidrópica, necrose individual e cariólise. Ligeira fibrose das áreas periportais, onde, por vezes, se encontram focos de infiltrado inflamatório, essencialmente linfocítico, com raros macrófagos.
II (Figura 25, 26 e 27)	Aumento da espessura da cápsula de Glisson por deposição de tecido fibroso. Focos de necrose hepatocitária e presença de infiltrado inflamatório. Tumefação e degenerescência hidrópica dos hepatócitos mais evidente do que no grau I. Por vezes verifica-se perda de arquitetura sinusoidal. Fibrose periportal mais intensa do que no grau I. Lobulação mais evidente devido a fibrose perilobular. Início do processo de pseudolobulação. Espessamento da parede de alguns vasos.
III (Figuras 28, 29, 30 e 31)	Aumento da espessura da cápsula de Glisson por deposição de tecido fibroso. Tumefação e degenerescência hidrópica dos hepatócitos similar ao grau II. Fibrose periportal e perilobular mais intensas do que no grau II. Focos de necrose com presença de infiltrado inflamatório. Espessamento da parede de alguns vasos. Presença de pseudolobulação. Focos de hiperplasia biliar.
IV (Figuras 32, 33 e 34)	Aumento da espessura da cápsula de Glisson por deposição de tecido fibroso. Os hepatócitos sem lesões são raros. Fibrose periportal e perilobular mais intensas do que no grau III. Pseudolobulação mais evidente do que no grau III. Focos de hiperplasia biliar. Distorção da túnica íntima e espessamento da média, com pseudoestratificação do epitélio dos vasos.

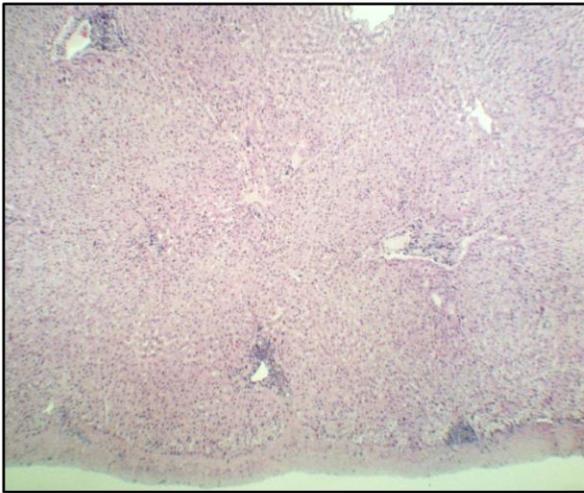


Figura 20: 4x. Grau I. Cápsula de Glisson espessada e infiltrado inflamatório em redor dos vasos.

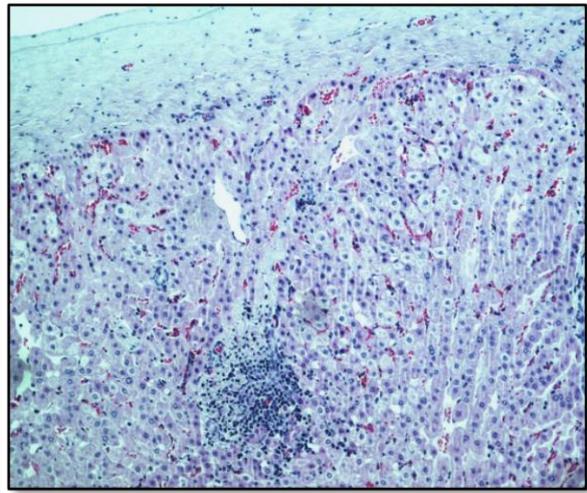


Figura 21: 10x. Grau I. Infiltrado inflamatório periportal, tumefação celular e degenerescência hidrópica dos hepatócitos.

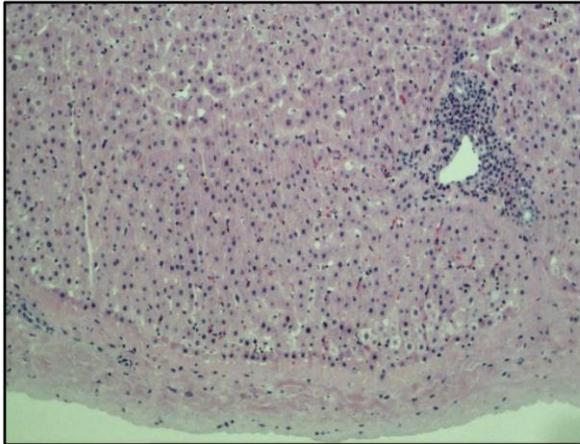


Figura 22: 10x. Grau I. Cápsula de Glisson espessada e infiltrado inflamatório em redor do vaso.

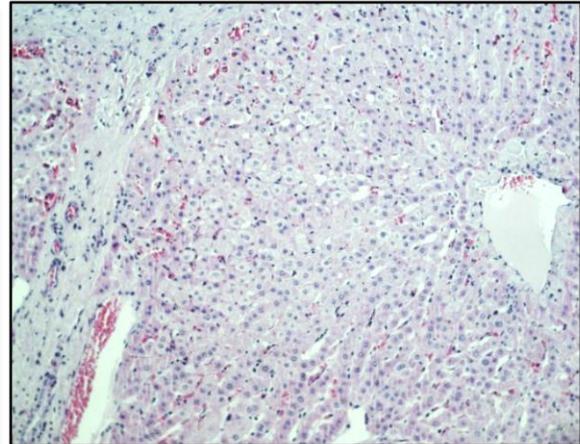


Figura 23: 10x. Grau I. Veia centrolobular e sinusoides. Ligeira fibrose perilobular com alguma desorganização do parênquima lobular.

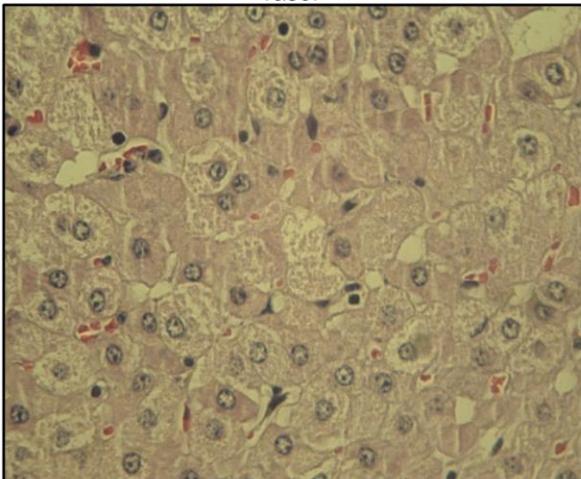


Figura 24: 40x. Grau I. Tumefação e degenerescência hidrópica dos hepatócitos, desorganização do parênquima lobular e cariólise.

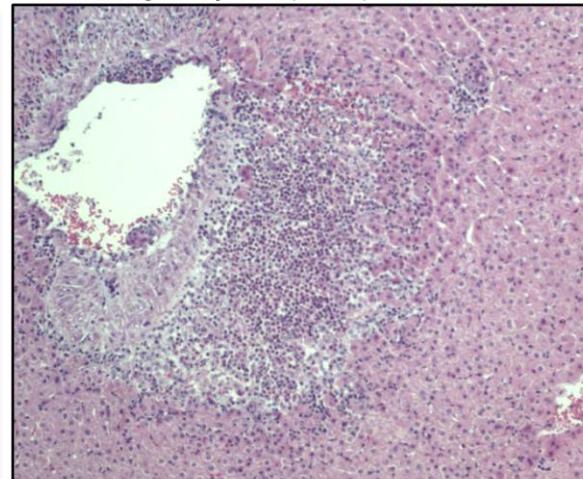


Figura 25: 10x. Grau II. Veia centrolobular rodeada por células inflamatórias.

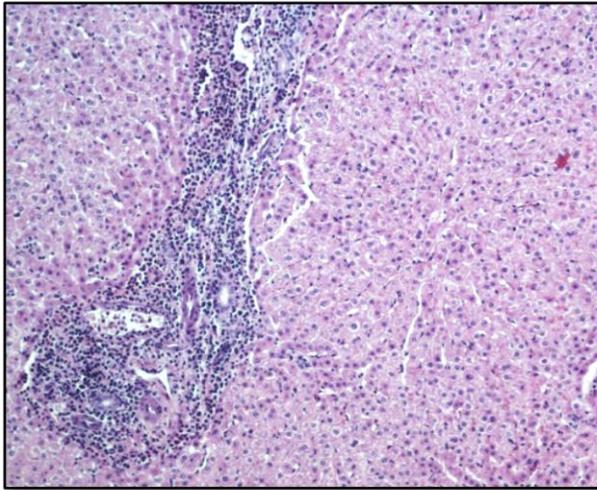


Figura 26: 10x.Grau II. Espaço porta com intenso infiltrado inflamatório.

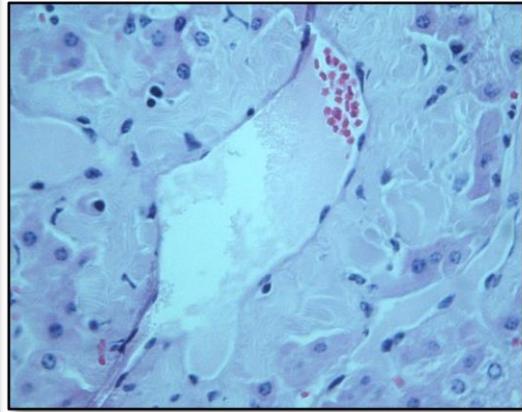


Figura 27: 40x.Grau II. Veia centrolobular com espessamento da túnica média.

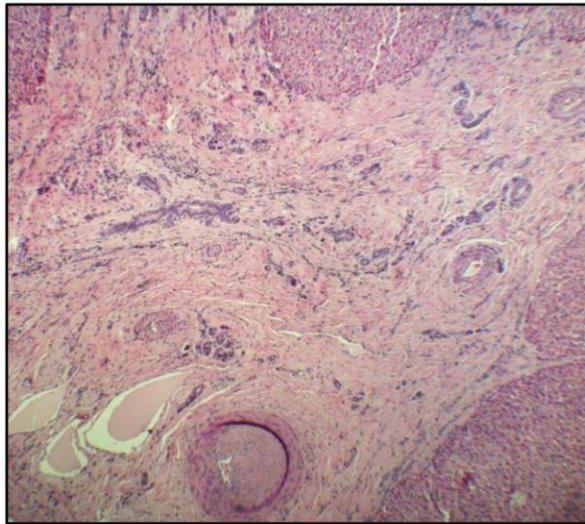


Figura 28: 4x. Grau III Fibrose intensa e hiperplasia biliar.

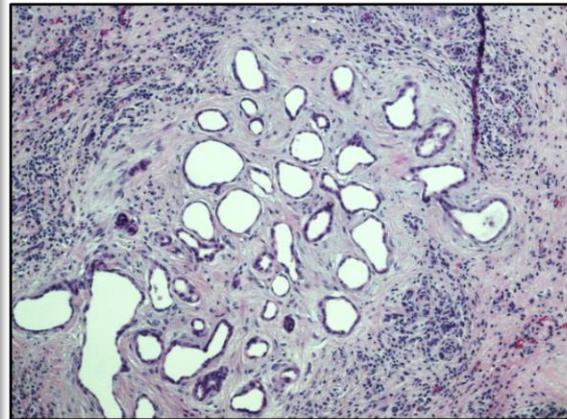


Figura 29: 10x. Grau III. Hiperplasia biliar com fibrose pericanalicular.

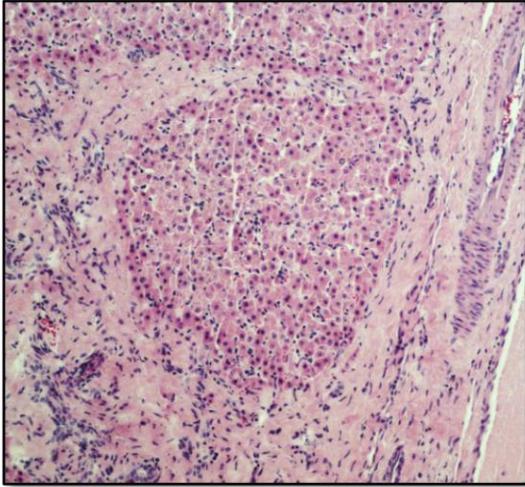


Figura 30: 10x. Grau III. Foco de regeneração hepática rodeado por fibrose.

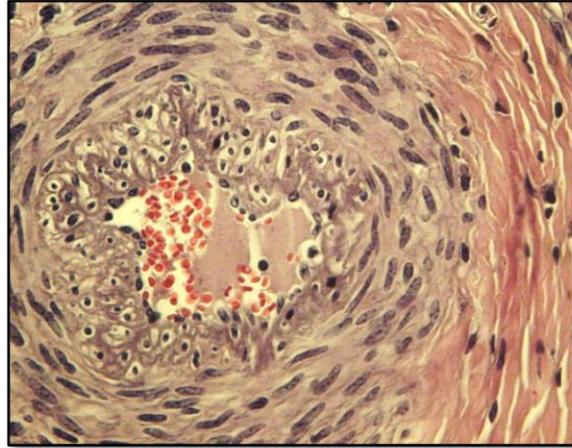


Figura 31: 40x. Grau III. Espessamento da túnica íntima e média do vaso.

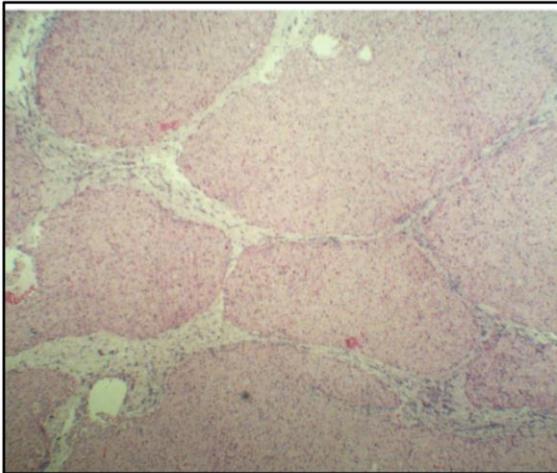


Figura 32: 4x. Grau IV. Pseudolobulação com fibrose do espaço interlobular.

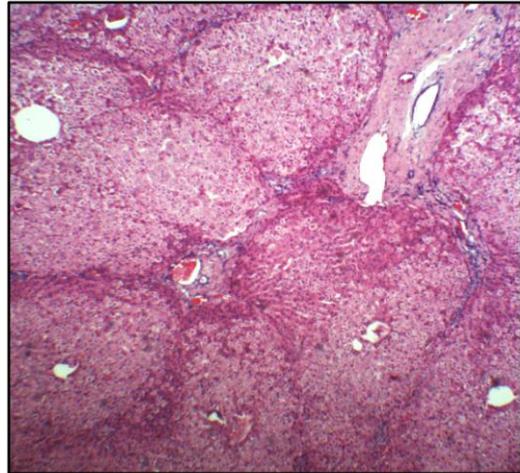


Figura 33: 4x. Grau IV. Padrão lobular com fibrose do tecido conjuntivo interlobular.

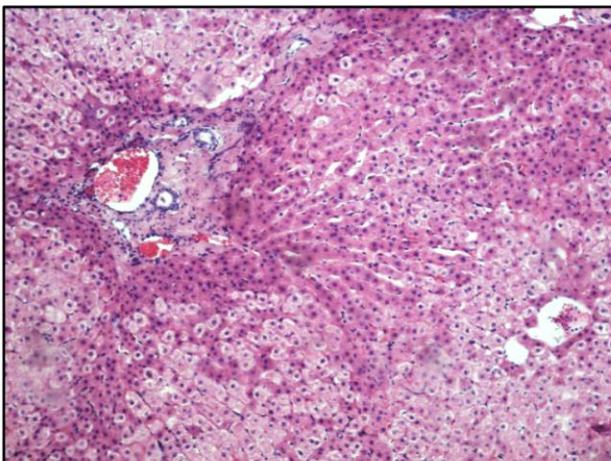


Figura 34: 10x. Grau IV. Degenerescência hidrópica centrolobular, apresentados os hepatócitos periportais lesões mais leves.

## 5. Discussão

---

### 5.1. Estudo retrospectivo

#### 5.1.1. Ilha de S. Miguel

O número total de bovinos abatidos no matadouro apresenta uma tendência crescente, o que não se verifica nos animais abatidos com lesões dermatológicas. Isso é notório, por exemplo no ano 2014, em que o abate total de bovinos foi mais significativo mas o número de casos de alterações da pele registou o menor número. Os valores da frequência anual de animais que entraram no matadouro com FTS e/ou HPQ são muito baixos, em torno de 1%, contudo no denominador estão contidos animais de aptidão cárnica e jovens machos de aptidão leiteira, cujo sistema produtivo em que se integram diminui a probabilidade de exposição tanto a compostos fotodinâmicos e hepatotoxinas, como à exposição solar. Assim, o valor real da frequência anual é maior se se tiver em conta apenas os animais expostos.

Constatou-se que a maioria dos animais, mais de 56%, apresenta à inspeção *ante mortem* FTS, o que pode ser explicado pela debilidade aguda que esta provoca em relação à HPQ, sendo mais óbvio para um produtor o envio para abate de um animal com FTS aguda do que um animal com HPQ.

Dois mil e treze foi ano em que maior número de animais entrou no matadouro, tanto com FTS como com HPQ, o que pode evidenciar que o agente etiológico que despoletou a FTS também agravou o estado de saúde dos animais com HPQ, deprimindo-os e aumentando a probabilidade do seu envio para abate. Facto que também explica que em 2014 se registre o menor número de entradas tanto de animais com FTS como com HPQ. A ação da esporidesmina é compatível com esta situação, pois as lesões que provoca diminuem a atividade hepatobiliar surgindo novos casos de FTS (secundária), por outro lado se o contato com a micotoxina for repetido há agravamento das lesões orgânicas já existentes, o que afeta a saúde e desempenho produtivo dos animais. Os dois meses em que se registou maior fluxo de animais no matadouro com o tipo de lesões estudadas foram Outubro e Setembro no que diz respeito à FTS, e Novembro e Outubro quanto à HPQ (Morris et al., 2002b; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A entrada de animais com lesões agudas da pele é assim coincidente com o final do Verão e início do Outono, facto que apoia a possibilidade da esporidesmina ser um dos agentes etiológicos com maior expressão (Dairy Australia FE Working Group, 2013). Quanto ao número de casos de HPQ também ser maior nesta época do ano, várias são as explicações possíveis, uma delas é: animais com lesões hepáticas anteriores das quais derivou o aparecimento de FTS, sendo no momento do abate visível a forma crónica - HPQ -, e chegando a época do ano em que as pastagens voltam a apresentar níveis elevados da micotoxina, os animais ainda que não manifestem lesões dermatológicas agudas, o fígado lesionado anteriormente volta a ser afetado, o que diminui o desempenho do animal em termos produtivos, sendo este um fator adjuvante na decisão de

envio para abate do animal. Outra razão é a sazonalidade da época de partos que implica que nesta altura do ano se sequem as vacas de modo a preparar a lactação seguinte, enviando-se para abate aquelas que não conseguiram ficar gestantes ou apresentam alterações do estado de saúde e de produção. Também o facto da maioria dos produtores agrícolas arrendar os terrenos que explora e do pagamento das rendas se realizar em Novembro, criou o hábito do envio para abate dos animais de refugo (animais menos produtivos, cuja diminuição da produção pode dever-se às alterações hepáticas crónicas provocadas pela esporidemia) de modo a obter meios para liquidar esses compromissos financeiros.

Tendo em conta a amostra total, a causa de rejeição hepática mais frequente, a seguir à rejeição total da carcaça, é a F/E (31,03%), o que suporta a possibilidade da FTS que os animais apresentam ou já apresentaram ser de origem hepatógena. Os animais com HPQ têm uma taxa de rejeição hepática por F/E 9,24% superior aos animais com FTS, o que sugere um efeito cumulativo e com aumento gradual das lesões hepáticas, tornando-se estas mais evidentes. Já nos animais com lesões agudas e crónicas da pele a rejeição hepática por F/E é 9,95% e 19,19% superior aos animais só com FTS ou HPQ, respetivamente. Hipoteticamente, animais com lesões dermatológicas agudas e crónicas, de origem hepatógena, apresentarão fígados com lesões mais evidentes pela acumulação das lesões anteriores, as quais por si só se agravam, com lesões atuais, o que não só aumenta a probabilidade do fígado ser rejeitado como aumenta a probabilidade de ser rejeitado por F/E (Morris et al., 2002b; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A correlação entre a inspeção *ante mortem* e a causa de rejeição hepática é fraca, contudo estatisticamente significativa ( $\Phi=0,384$ ; C de Pearson=0,358; coeficiente V de Cramer=0,272;  $\lambda$  simétrico=0,062).

As principais causas apontadas para a rejeição total das carcaças foram a anemia/caquexia/emaciação, FTS aguda e neoplasia da bexiga. A rejeição da carcaça por FTS aguda está diretamente relacionada com as lesões dermatológicas presentes, quanto à rejeição por anemia/caquexia/emaciação em animais com FTS pode dever-se à diminuição da ingestão de alimento por falta de apetite, *stress*, dor, prostração e fotofobia, já em animais com HPQ pode estar relacionada com a perda de função hepática que impede um metabolismo eficiente dos nutrientes ingeridos (Smith, 2000). A correlação entre a inspeção *ante mortem* e a causa de rejeição da carcaça é fraca mas estatisticamente significativa ( $\Phi=0,379$ ; C de Pearson=0,355; coeficiente V de Cramer=0,268;  $\lambda$  simétrico=0,078).

### 5.1.2. Ilha Terceira

O número total de bovinos abatidos no matadouro apresenta uma tendência crescente, exceto no ano 2014 em que se regista uma descida, o que tal como na Ilha de S. Miguel não se verifica nos animais abatidos com lesões dermatológicas. Os valores da frequência anual de animais que entraram no matadouro com FTS e/ou HPQ são ainda mais baixos do que em S. Miguel,

cerca de metade (0,48%), apontando-se para este baixo valor as mesmas razões enunciadas para a Ilha de S. Miguel.

Constatou-se que, também nesta ilha, a maioria dos animais, 56,72%, que entraram no matadouro com lesões dermatológicas possíveis de serem secundárias às lesões hepáticas provocados pela micotoxina esporidesmina foram agudas (FTS), ao que se soma 1,6% respeitante a animais com lesões agudas (FTS) e crónicas (HPQ).

Dois mil e sete foi o ano em que maior número de animais entrou no matadouro com FTS, já no que respeita a HPQ foi o ano 2011. No ano 2014, como em S. Miguel registou-se o menor número de casos de ambas as situações. Nesta ilha, a relação entre os anos com maior número de entradas no matadouro e a causa de inspeção *ante mortem* é menos clara. Os dois meses em que se registou maior fluxo de animais no matadouro com o tipo de lesões estudadas foram Novembro e Junho no que diz respeito à FTS, e Outubro e Julho quanto à HPQ. A entrada de maior número de animais com lesões agudas da pele no matadouro coincide com o início do Verão e o final do Outono, não sendo de uma forma tão clara como em S. Miguel compatível com pitomicototoxicose. Quanto ao número de casos de HPQ, aplica-se o mesmo raciocínio usado nos casos de FTS, podendo apenas justificar-se o número de casos em Novembro, utilizando para isso o mesmo raciocínio aplicado à Ilha de S. Miguel.

A maioria dos fígados dos animais com lesões dermatológicas é rejeitada (78,3%), sendo a taxa cerca de 15% menor quando comparada com a taxa de rejeição hepática na Ilha de S. Miguel. Esta diferença deve-se, em parte, à menor velocidade da linha de abate, uma vez que o número de animais abatidos é significativamente menor, o que permite uma limpeza mais pormenorizada dos fígados com alterações, possibilitando a sua aprovação. Quando a carcaça é aprovada e o fígado inspecionado a causa de rejeição mais frequente é, como em S. Miguel, a F/E (26,9%), o que suporta a possibilidade da FTS que os animais apresentam ou já apresentaram ser de origem hepatógena. Ao contrário de S. Miguel, na Ilha Terceira a rejeição hepática por F/E não é maior nos animais com HPQ ou com FTS/HPQ, comparativamente àqueles com FTS, pelo contrário, é menor. A correlação entre a inspeção *ante mortem* e a causa de rejeição hepática é fraca, contudo estatisticamente significativa ( $\Phi=0,250$ ; C de Pearson=0,243; coeficiente V de Cramer=0,177;  $\lambda$  simétrico=0,049).

As principais causas apontadas para a rejeição total das carcaças foram o carcinoma escamoso da pele, FTS aguda e anemia/caquexia/emaciação. A rejeição da carcaça por FTS aguda está diretamente relacionada com as lesões dermatológicas presentes, quanto à rejeição por anemia/caquexia/emaciação em animais com FTS pode dever-se à diminuição da ingestão de alimento por falta de apetite, *stress*, dor, prostração e fotofobia, já em animais com HPQ pode estar relacionada com a perda de função hepática que impede um metabolismo eficiente dos nutrientes ingeridos (Smith, 2000). Quanto ao carcinoma escamoso da pele este pode ter origem

nas lesões repetidas a que a pele está exposta, o que é agravado pelas lesões agudas e crônicas fotossensíveis que estes animais apresentam. A correlação entre a inspeção *ante mortem* e a causa de rejeição da carcaça é fraca mas estatisticamente significativa ( $\Phi=0,300$ ; C de Pearson=0,212; coeficiente V de Cramer=0,287;  $\lambda$  simétrico=0,088).

O número de esporos atinge o pico anual no final do Verão e início do Outono, encontrando-se, principalmente nos meses Setembro (2001, 2002, 2005, 2006, 2007, 2009, 2011, 2012, 2013, 2014) e Outubro (2003, 2010, 2014), quando as condições meteorológicas e de substrato permitem o aumento do número de esporos na pastagem (Rodríguez *et al.*, 2010; Dairy Australia FE Working Group, 2013) .

O maior número de consultas a animais com FTS realizadas pela equipa veterinária da UNICOL, ocorreram entre os meses de Agosto e Outubro, quando as contagens de esporos são mais elevadas, o que sugere que muitos dos casos tenham como agente etiológico a micotoxina esporidesmina. Por outro lado, o final do Verão e início do Outono é uma época caracterizada pela escassez alimentar, o que predispõe à ocorrência de intoxicações por plantas tóxicas, normalmente não ingeridas pelos animais quando estes dispõem de alimento adequado. O senso comum que passa de geração em geração e a formação disponibilizada aos produtores permite que estes conheçam com maior exatidão as plantas cujo consumo afetará a saúde dos seus animais. Assim, a probabilidade dos casos de FTS nesta época do ano se deverem à pitomicotoxicose é elevada. Os casos de FTS no matadouro, abordados anteriormente, não seguem uma distribuição anual tão linear quanto as consultas realizadas pela mesma causa, sendo mesmo Setembro, o mês de todos os anos estudados aquele que regista um menor número de entradas no matadouro de animais com lesões agudas da pele.

## 5.2. Estudo no matadouro

### 5.2.1. Ilha de S. Miguel

A idade dos indivíduos que compõem a amostra é muito variável ( $\bar{x}=80,34$ ;  $s=29,847$ ), havendo, por exemplo, entre o indivíduo mais velho e o mais novo uma diferença de 175 meses ( $\approx 15$  anos). A média de idades dos indivíduos cujo fígado apresentou F/E ( $\bar{x}=84,42$ ;  $s=30,096$ ) é maior do que a média da amostra, assim como a média da idade dos indivíduos com lesões de F/E compatíveis com pitomicotoxicose ( $\bar{x}=86,40$ ;  $s=29,817$ ). Entre os quatro graus de F/E compatíveis com pitomicotoxicose, os graus II ( $\bar{x}=89,04$ ;  $s=30,311$ ), III ( $\bar{x}=93,24$ ;  $s=32,372$ ) e IV ( $\bar{x}=86,83$ ;  $s=30,721$ ) são os que apresentam maior média de idades, tendo o grau I ( $\bar{x}=79,83$ ;  $s=26,306$ ) menor média. Pode concluir-se que os animais da amostra com F/E hepática, assim como aqueles cujas lesões são compatíveis com pitomicotoxicose são, em média, mais velhos do que os restantes, o que sugere um agravamento periódico e cumulativo das lesões hepáticas, característico dos animais intoxicados com esporidesmina. Os animais

cujo grau de F/E compatível com pitomicototoxicose é mais elevado (II, III e IV) têm idade média superior à da amostra, sendo isso mais notório nos graus II e III. Ainda que os animais com grau IV apresentem média de idades superior à média da amostra, esta é menor do que nos graus II e III, o que pode relacionar-se com a menor longevidade dos animais devido às lesões que afetam o desempenho da atividade hepática. A correlação estatística representada pelo Ró Spearman ( $R=0,154$ ) indica uma relação positiva entre o aumento da idade e um maior grau de lesões hepáticas de F/E compatíveis com pitomicototoxicose.

A maior parte dos animais da amostra (94,29%) não revelaram quaisquer alterações na inspeção *ante mortem*, quando apresentam é devido, na maioria das vezes, a anemia/caquexia/emaciação. Apenas 0,15% dos animais da amostra apresentaram hiperqueratose. Os animais que à inspeção *ante mortem* apresentaram HPQ revelaram na inspeção *post mortem* do fígado grau intenso (III) de F/E, sendo compatível com a intoxicação por esporidesmina (Faull, 1991; Dairy Australia FE Working Group, 2013).

Tal como a idade, o peso das carcaças quentes amostradas é muito variável ( $\bar{x}=261,34$ ;  $s=49,491$ ), sendo a diferença entre o peso máximo e mínimo de 307Kg. Os animais com fibrose/esclerose são, em média, mais leves ( $\bar{x}=257,44$ ;  $s=47,428$ ) do que a amostra, assim como os animais cujas lesões são compatíveis com pitomicototoxicose ( $\bar{x}=255,76$ ;  $s=48,263$ ). Entre os graus de F/E compatíveis com pitomicototoxicose, as médias do peso diminuem à medida que aumenta o grau de lesão hepática, o que pode sugerir que a existência de lesões no fígado de F/E compatíveis com pitomicototoxicose pode influenciar o peso da carcaça (Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A correlação estatística apresentada pelo Ró Spearman indica que há uma correlação negativa ( $R= -0,089$ ) entre o grau de F/E apresentado pelo fígado e o peso do animal em questão, assim animais com graus mais elevados de F/E hepática dão origem a carcaças com menos peso.

A avaliação das carcaças segundo a classificação SEUROP mostrou que a classe com maior frequência relativa foi, em toda amostra, nas carcaças cujos fígados apresentaram F/E, fosse ou não compatível com pitomicototoxicose e em todos os graus de F/E compatível com pitomicototoxicose, a classe medíocre. As carcaças cujas origens são animais de categoria E, são subprodutos de um sistema produtivo que objetiva a produção leiteira ou o nascimento de crias, neste caso a produção leiteira. Assim, além destes animais não serem produzidos com o objetivo da sua carcaça apresentar o peso, conformação e teor de gordura mais elevados, também a manutenção de uma condição corporal mediana diminui a probabilidade de desenvolvimento de doenças metabólicas. Ainda que a presença de lesões hepáticas de F/E seja acompanhada de menor peso das carcaças a que pertencem os fígados afetados, isso não se reflete na distribuição da massa muscular e do teor de gordura na carcaça.

A taxa de reprovação de carcaças com origem em animais cujos fígados apresentaram F/E é mais baixa do que a taxa de reprovação da amostra ( $7,2\% < 8,79\%$ ), não havendo diferenças significativas na taxa de aprovação. Nas carcaças provenientes de animais com lesões hepáticas compatíveis com pitomicototoxicose a taxa de reprovação é maior do que na amostra ( $9,6\% > 8,79\%$ ), enquanto a taxa de aprovação das carcaças é menor do que na amostra ( $72,3\% < 77\%$ ). Tendo em conta os diferentes graus de lesão hepática compatível com pitomicototoxicose, a taxa de reprovação da carcaça aumenta à medida que os graus de lesão aumentam, a taxa de aprovação é maior nos graus I e II e menor nos graus III e IV de lesão no fígado. À medida que o grau de lesão hepática aumenta, a probabilidade de deterioração do estado geral de saúde do animal é maior, o que se pode refletir no aumento da taxa de reprovação da carcaça em graus superiores de lesão do fígado (Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A correlação estatística entre o resultado da inspeção da carcaça e o grau de F/E do fígado é positiva, sendo dada pelas medidas de associação baseadas no Qui-quadrado ( $\Phi=0,164$ ; C de Pearson= $0,162$ ; Coeficiente V de Cramer= $0,095$ ). Quando a carcaça de animais com F/E hepática, de animais cujas lesões hepáticas anteriores são compatíveis com pitomicototoxicose e de animais com graus III e IV de F/E compatível com pitomicototoxicose é rejeitada, isto acontece principalmente pela presença de neoplasia na bexiga tal como acontece na amostra total. Nos graus I e II de lesões hepáticas compatíveis com pitomicototoxicose a razão principal é anemia/caquexia/emaciação. A correlação estatística entre o grau de F/E do fígado e a causa de rejeição da carcaça de onde este provém é positiva, sendo dada pelas medidas de associação baseadas no Qui-quadrado ( $\Phi=0,741$ ; C de Pearson= $0,595$ ; Coeficiente V de Cramer= $0,370$ ).

A taxa de rejeição das diferentes vísceras dos animais com F/E no fígado, assim como dos animais cujas lesões hepáticas são compatíveis com pitomicotoxiose e mesmo comparando entre os diversos graus de F/E, não é muito variável, sendo a principal fonte de variabilidade a rejeição total das carcaças.

Apesar dos fígados inspecionados apresentarem, na maioria das vezes, mais do que um tipo de alterações, devido à logística e às condicionantes informáticas, a causa de rejeição hepática indicada pelo matadouro é normalmente uma. Dos 550 fígados com F/E que foram rejeitados, apenas 57,3% foi devido a esta causa, percentagem que aumenta para 65,1% (181 de 278 fígados) quando os fígados rejeitados além de F/E são compatíveis com pitomicototoxicose. De entre os graus de lesão hepática compatíveis com pitomicototoxicose, só no grau I menos de 50% (43,4%) dos fígados com F/E não são rejeitados por esta causa, já que no grau II (69,2%), III (87,1%) e IV (94,7%) a percentagem aproxima-se dos 100% quanto mais grave é o grau de lesão hepática.

### 5.2.2. Ilha Terceira

A idade dos indivíduos que compõem a amostra é muito variável ( $\bar{x}=81,28$ ;  $s=32,551$ ), havendo, por exemplo, entre o indivíduo mais velho e o mais novo uma diferença de 170 meses ( $\approx 14$  anos). A média de idades é muito próxima da apresentada na amostra estudada em S. Miguel. A média da idade dos indivíduos cujo fígado apresentou F/E ( $\bar{x}=89,52$ ;  $s=33,179$ ) é maior do que a média da amostra, assim como a média da idade dos indivíduos com lesões de F/E compatíveis com pitomicototoxicose ( $\bar{x}=93,16$ ;  $s=29,741$ ). Entre os quatro graus de F/E compatíveis com pitomicototoxicose, os graus I ( $\bar{x}=90,70$ ;  $s=31,159$ ), II ( $\bar{x}=95,67$ ;  $s=28,237$ ) e III ( $\bar{x}=96,11$ ;  $s=31,186$ ) são os que apresentam maior média de idade, tendo o grau IV ( $\bar{x}=87,25$ ;  $s=23,372$ ) média inferior à média da amostra. Pode concluir-se que os animais da amostra com F/E hepática, assim como aqueles cujas lesões são compatíveis com pitomicototoxicose são, em média, mais velhos do que os restantes, o que sugere um agravamento periódico e cumulativo das lesões hepáticas, característico dos animais intoxicados com esporidesmina. Os animais cujo grau de F/E compatível com pitomicototoxicose é mais elevado (I, II, III) têm idade média superior à da amostra, sendo isso mais notório nos graus II e III, o grau IV apresenta média de idade inferior talvez porque a longevidade dos animais com lesões de grau IV é comprometida pelo desempenho insatisfatório do fígado. A correlação estatística representada pelo Ró Spearman ( $R=0,288$ ) indica uma relação positiva entre o aumento da idade e um maior grau de lesões hepáticas de F/E apresentadas. A média da idade é em qualquer dos casos superior na Ilha Terceira quando comparada com a amostra da Ilha de S. Miguel, assim como a correlação entre o aumento da idade e um grau de lesão hepática maior.

Tal como na Ilha de S. Miguel a maior parte dos animais da amostra (92,7%) não revelaram quaisquer alterações na inspeção *ante mortem*, mas quando há alterações a registar elas são principalmente do foro muscoesquelético. Nesta ilha os casos de HPQ detetados à inspeção *ante mortem* sobem para 1% apenas (Faull, 1991; Dairy Australia FE Working Group, 2013). Os animais que à inspeção *ante mortem* apresentaram HPQ revelaram na inspeção *post mortem* do fígado grau intenso (III) e severo (IV) de F/E, sendo compatível com a intoxicação por esporidesmina.

Tal como a idade, o peso das carcaças quentes amostradas é muito variável ( $\bar{x}=259,09$ ;  $s=42,418$ ), sendo a diferença entre o peso máximo e mínimo de 233 Kg. Os animais com F/E são, em média, ligeiramente mais pesados do que a amostra, o que não acontece com os animais cujas lesões são compatíveis com pitomicototoxicose. Entre os graus de F/E compatíveis com pitomicototoxicose, as médias do peso não só são maiores do que a média da amostra nos dois graus inferiores (I e II) como há um aumento do grau I para o grau II, nos dois graus superiores (grau III e IV) o decréscimo em relação à média da amostra é muito acentuado o que pode sugerir, neste caso, que apenas os graus III e IV de lesão hepática estão relacionados com um menor peso da carcaça (Smith & O'Hara, 1978; Dairy Australia FE Working Group, 2013). A

correlação estatística apresentada pelo Ró Spearman indica que a correlação negativa entre o grau de F/E apresentado pelo fígado e o peso do animal em questão não é significativa.

A avaliação das carcaças segundo a classificação SEUROP mostrou que a classe com maior frequência relativa foi, em toda amostra, nas carcaças cujos fígados apresentaram F/E, fosse ou não compatível com pitomicotxicose e nos graus I, II, e III de F/E compatível com pitomicotxicose, a classe medíocre superior. A exceção é o grupo IV de lesões hepáticas em que classe medíocre foi a mais frequente. A classificação quanto ao teor de gordura foi em todos os grupos pertencente à classe reduzida, não havendo, como na conformação SEUROP correlação estatística significativa com o grau de lesão hepática.

As taxas de reprovação, retenção para observação e aprovação das carcaças originárias dos animais cujos fígados apresentaram F/E são similares às taxas da amostra. Nas carcaças provenientes de animais com lesões hepáticas compatíveis com pitomicotxicose a taxa de reprovação é maior do que na amostra ( $5,8\% > 3,7\%$ ), assim como a taxa de retenção para observação ( $9,1\% > 7,3\%$ ), quanto à taxa de aprovação das carcaças esta é menor do que na amostra ( $85,1\% < 89\%$ ). Tendo em conta os diferentes graus de lesão hepática compatível com pitomicotxicose, a taxa de reprovação da carcaça aumenta à medida que os graus de lesão aumentam, a taxa de aprovação é maior nos graus I e III e menor nos graus II e IV de lesão no fígado. A correlação estatística entre o resultado da inspeção da carcaça e o grau de F/E do fígado é positiva, sendo dada pelas medidas de associação baseadas no Qui-quadrado ( $\Phi=0,243$ ; C de Pearson= $0,236$ ; Coeficiente V de Cramer= $0,172$ ).

Quando a carcaça de animais com F/E hepática, de animais cujas lesões hepáticas anteriores são compatíveis com pitomicotxicose e de animais com grau IV de F/E compatível com pitomicotxicose é rejeitada, isto acontece principalmente pela presença de osteíte purulenta tal como acontece na amostra total. Nos graus I, II e III de lesões hepáticas compatíveis com pitomicotxicose as razões principais são anemia/caquexia/emaciação, peritonite e traumatismos extensos, e abscessos e traumatismos extensos, respetivamente. A correlação estatística entre o grau de F/E do fígado e a causa de rejeição da carcaça de significativa estatisticamente.

A taxa de rejeição das diferentes vísceras dos animais com F/E no fígado, assim como dos animais cujas lesões hepáticas são compatíveis com pitomicotxicose e mesmo comparando entre os diversos graus de F/E, não é muito variável, sendo a principal fonte de variabilidade a rejeição total das carcaças.

Apesar dos fígados inspecionados apresentarem, na maioria das vezes, mais do que um tipo de alterações, devido à logística e às condicionantes informáticas, a causa de rejeição hepática indicada pelo matadouro é normalmente uma. Dos 178 fígados com F/E que foram rejeitados, apenas 37,01% foi devido a esta causa, percentagem que aumenta ligeiramente para 38,32%

quando os fígados rejeitados além de F/E são compatíveis com pitomicotoxicose. De entre os graus de lesão hepática compatíveis com pitomicotoxicose, nos graus I e II menos de 50% (20,41% e 34,21%, respetivamente) dos fígados com F/E são rejeitados por esta causa, já no grau III (94,12%) a quase totalidade dos fígados é rejeitada por esta causa, atingindo-se os 100% no grau IV.

Conclui-se que ainda que perto de 93% da amostra se apresente sem quaisquer alterações à inspeção *ante mortem*, só 1% apresenta hiperqueratose, a inspeção hepática *post mortem* revelou a existência de lesões compatíveis com pitomicotoxicose em 29,51% dos fígados observados (121 fígados de 410 observados), por outras palavras, mais de 50% (57,08%) dos fígados que apresentaram F/E, esta era compatível com pitomicotoxicose, o que está de acordo com a bibliografia citada (Faull, 1991; Dairy Australia FE Working Group, 2013) .

### 5.2.3. Análise histopatológica

A análise histopatológica das amostras, respeitantes a vários graus de lesão hepática, não só revela lesões compatíveis com a intoxicação por esporidesmina (Dodd, 1959; Worker, 1960; Crawley *et al.*, 1961; Glenn *et al.*, 1965; Greenwood & Williamson, 1985; Kellerman & Coetzer, 1985 referido por Pinto *et al.*, 2005; Flaoyen *et al.*, 1991; Smith & Embling, 1991; Flaoyen & Smith, 1992; Smith, 2000; Ozmen *et al.*, 2008; Dairy Australia FE Working Group, 2013), como a categorização macroscópica corresponde a um grau crescente de lesão hepática a nível microscópico.

O grau de fibrose é notoriamente crescente à medida que os graus de lesão aumentam, assim como a hiperplasia biliar. Em graus mais severos, a tentativa de regeneração hepática manifesta-se pelo desenvolvimento de pseudolóbulos.

## 6. Conclusões

---

Tendo em conta o estudo retrospectivo em S. Miguel no que diz respeito aos meses de maior entrada, no matadouro, de animais com lesões dermatológicas na pele, assim como, a principal causa de rejeição hepática após inspeção *post mortem* do fígado demonstram, não só, que a FTS será principalmente de origem hepatógena, como em muitos casos o agente etiológico será, possivelmente, a esporidesmina. Na Ilha Terceira essa afirmação não pode ser feita, contudo os valores altos do número de esporos das pastagens vigiadas e o aumento contemporâneo do número de consultas devido a FTS, indicam que a doença tem representatividade na Ilha.

Pela percentagem de fígados, observados no estudo no matadouro, cujas lesões indicam compatibilidade com a intoxicação por esporidesmina e que são rejeitados devido a outras causas, pode deduzir-se que os fígados rejeitados no estudo retrospectivo, ainda que pudessem apresentar lesões leves de F/E hepática compatíveis com pitomicotoxicose, muito provavelmente

foram rejeitados por outra causa, o que não os excluí do grupo de animais que provavelmente apresentam lesões dermatológicas devido à ação lesiva da esporidesmina no fígado.

Se se considerar a diferença entre a frequência de fígados com F/E no estudo realizado no matadouro e a frequência em que a reprovação hepática é realmente devido a essa causa, conclui-se que para a causa de reprovação hepática, F/E, do estudo retrospectivo, ser tão frequente é porque o grau de lesão é considerável.

As lesões histopatológicas observadas são compatíveis com as lesões provocadas pela esporidesmina, o que possibilita que a avaliação macroscópica dos fígados defina, em primeira instância, a presença de lesões compatíveis com pitomicotoxicose.

A correlação positiva entre o aumento do grau de lesão hepática compatível com pitomicotoxicose e o aumento da idade, assim como a correlação negativa entre o aumento do grau de lesão hepática compatível com pitomicotoxicose e a diminuição do peso da carcaça quente revelam que os animais mais velhos são aqueles que possuem lesões hepáticas mais graves o que pode se refletir também num menor peso da carcaça

Conclui-se que ainda que perto de 95% da amostra do estudo no matadouro de S. Miguel se apresente sem quaisquer alterações à inspeção *ante mortem*, só 0,15% apresenta hiperqueratose, a inspeção hepática *post mortem* revelou a existência de lesões compatíveis com pitomicotoxicose em 23,37% dos fígados observados (311 fígados de 1331 observados), ou seja, em cerca de 50% (52,01%) dos fígados que apresentaram fibrose/esclerose as alterações apresentaram compatibilidade com pitomicotoxicose, o que está de acordo com a bibliografia citada. Na Ilha Terceira, a frequência de 1% de casos de HPQ na inspeção *ante mortem*, contrasta com uma taxa de compatibilidade com a pitomicotoxicose de 29,51% (121 fígados dos 410 observados) que aumenta para 57,07% se se tiver em conta apenas aquele com F/E. Estes valores estão dentro dos intervalos de prevalência de lesões hepáticas indicadas pela bibliografia, em locais onde a intoxicação por esporidesmina é possível. A existência de frequências de lesões hepáticas tão elevadas em animais que em vida não mostram qualquer alteração de saúde vislumbra a dimensão verdadeira desta patologia.

Dadas as condições ideais para o desenvolvimento de *P. chartarum* nos Açores se verificarem, assim como a presença de animais suscetíveis à ação da esporidesmina, urge a necessidade de encontrar medidas seguras e mais definitivas de controlo da doença, o que parece ser possível através da via genética.

## 7. Bibliografia

---

- Amyes N & Hawkes A (2014) Ramguard - Increasing the tolerance to facial eczema in New Zealand sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **74**:154 - 157.
- Association I (2015) *Database Copyright © 2015 MycoBankin English* [Online] Available at: <http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000067&Rec=21885&Fields=AI> [Acedido em 26 8 2015].
- Athernthon L, Brewer D & Taylor A (1974) *Pithomyces chartarum*: a fungal parameter in the aetiology of some diseases of domestic animals. Em: *Mycotoxins*. Amsterdam: Elsevier, pp. 29 - 68.
- Bbosa G, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo W & Kyegombe D (2013) Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. Em: M. Razzaghi-Abyaneh, ed. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. s.l.:InTech, pp. 239 - 265.
- Bennett A (1980) Mycotoxins and mycotoxicoses. *BioScience*, **30**:8:512 - 515.
- Bennett J (1987) Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*, **100**:3-5
- Bennett J & Klich M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**:3:497 - 511.
- Bennison J, Nottingham R, Key E & Parkin J (2010b). The effect of zinc oxide and elemental zinc boluses on the concentrations of Zinc serum and faeces, and on providing protection from natural *P. chartarum* challenge in calves. *New Zealand Vet. J.*, **58**:196 - 200.
- Bennison J, Nottingham R, Key E & Parkins J (2010a) The effect of zinc oxide and elemental zinc boluses on the concentrations of Zn in serum and faeces, and on providing protection from natural *Pithomyces chartarum* challenge in sheep. *New Zealand Vet. J.*, **58**:201 - 206.
- Bézille P, Braun J & Le Bars J (1984) Première identification de l'eczéma facial chez les ovine en Europe. Aspects épidémiologiques, cliniques et biologiques. *Recl. Méd. Vét.* , **160**:339 - 347.
- Bonnefoi M, Braun J, Bézille P, LeBars J, Sawadogo G & Thouvenot J (1989) Clinical biochemistry of sporidesmin natural intoxication (facial eczema) of sheep. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* ,**27**:13-18.
- Bonnefoi M & Sauvagnac P (1988) Eczéma Facial des Ruminants et Sporidesmines. *Annales de Recherches Vétérinaires*, **19**:2:91 - 106.
- Brewer D, Russel D, Amaral R & Aycardi E (1989) An examination of North and South American isolates of *P. chartarum* for production of sporidesmin and sporidemolides. *Proc. N. S. Inst. Sci.*,**38**:2:73-81
- Brook P (1959) A volumetric spore trap for sampling pastures. *New Zealand J. Agr. Res.*, **2**:690 - 693.
- Brook P (1963) Ecology of the fungus *Pithomyces chartarum*. *New Zealand J. Agr. Res.*,**6**:147 - 228.
- Brook P (1969) *P. chartarum* in pasture, and measures for prevention of facial eczema. *J. sto. Prod. Res.*, **5**:203-09
- Brook P & Mutch V (1964) Field control of facial eczema os sheep. *New Zealand J. Agr. Res.*, **7**:2:138-145.
- Bullock G, Eakins M, Sawyer B. & Slater T (1974) Studies on bile secretion with the aid of the isolated perfused rat liver. 1. Inhibitory action of sporidesmin and icterogenin. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*,**186**:333 - 356.
- Butler E & Crisan E (1977) A key to the genera and selected species of mycotoxin producing fungi. Em: M. Dekker, ed. *Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicosis* . New York: s.n., pp. 1 - 20.

- Campbell A, Meyer H, Henderson H & Wesselink C (1981) Breeding for facial eczema resistance - a progress report. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **41**: 273-278.
- Campbell A, Mortimer P, Smith B, Clarke J & Ronaldson J (1975) Breeding for facial eczema resistance?. *Proceedings of the Ruakura Farmer's Conference*, pp. 62-64.
- Campbell W, Dombroski G, Sharma I, Partridge A & Collett M (2010) Photodynamic chlorophyll a metabolites, including phytoporphyrin (phylloerythrin), in the blood of photosensitive livestock: overview and measurement. *New Zealand Vet. J.*, **58**:3:146 - 154.
- Carolino N, Gama L, Baptista T. & Silveira M (2009) *Avaliação Genética da Raça Bovina Charolesa*, Vale de Santarém: Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P..
- Chapman R & di Menna M (1981) *Predicting danger periods by spores counting.* , Wellington, New Zealand: Ministry of Agriculture and Fisheries.
- Clare N (1952) *Photosensitization in Diseases of Domestic Animals, Review Series n.º 3*. Commonwealth Bureau of Animal Wealth, Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, England, s.n.
- Clare N & Gumbley J (1962) Some factors which may affect the toxicity of spores of *Pithomyces chartarum* (Berk & Curt.) M. B. Ellis collected from pasture. *New Zealand J. Agri. Res.*, **5**:36 - 42.
- Clare N & Mortimer P (1964) The effect of mercury arc radiation and sunlight on the toxicity of water solutions of sporidesmin to rabbits. *New Zealand J. Agr. Res.*, **7**:258 - 263.
- Clive A, Ruth A & Bennie J (1981) Absence of sporidesmin production by twelve Texas isolates of *Pithomyces* spp.. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**:1:212 - 215.
- Coetzer J, Kellerman T, Sadler W & Bath G (1983) Photosensitivity in South Africa. V. A comparative study of pathology of the ovine hepatogenous photosensitivity diseases, facial eczema and geeldikkop (*Tribulosis ovis*), with special reference to their pathogenesis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **50**:59-71
- Collett M (2014) Bile duct lesions associated with turnip (*Brassica rapa*) photosensitization compared with those due to sporidesmin toxicosis in dairy cows. *Veterinary Pathology*, **51**:5:986 - 991.
- Collin R, Briggs L & Towers N (1995) Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sporidesmin in pastures. *New Zealand J. Agr. Res.*, **38**:297 - 302.
- Collin R, Odriozola E & Towers N (1998a) Sporidesmin production by *Pithomyces chartarum* isolates from Australia, Brazil, New Zealand and Uruguay. *Mycological Research*, **102**:163-166.
- Collin R, Smith B & Towers N (1996) Lack of toxicity of a nonsporidesmin-producing strain of *Pithomyces chartarum* in cell culture and when dosed to lambs. *New Zealand Vet. J.*, **44**:131 - 134.
- Collin R & Towers N (1995b) Competition of a sporidesmin-producing *Pithomyces* strain with a non-toxicogenic *Pithomyces* strain. *New Zealand Vet. J.*, **43**:149 - 152.
- Collin R & Towers N (1995a) First report isolation from New Zealand pasture of *Pithomyces chartarum* unable to produce sporidesmin. *Mycopathologia*, **130**:37 - 40.
- Collin R, Scheider E, Briggs L & Towers N (1998b) Development of immunodiagnostic field tests for the detection of the mycotoxin, sporidesmin a. *Food and Agricultural Immunology*, **10**:2:91 - 104.
- Commission Recommendation 2006/576/EC (2006) *Official Journal of the European Union*. s.l.:s.n.
- Commission Recommendations 2013/165/EU, 2013. *Official Journal of the European Union*. s.l.:s.n.
- Commission Regulation 1881/2006 (2006) *Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*.

- Cousins R (1985) Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Reviews*, **65**:238 - 309.
- Craig A, Klotz J & Durringer J (2015) Cases of ergotism in livestock and associated ergot alkaloid concentrations in feed. *Frontiers in Chemistry*, **3**:8:1 - 6.
- Crawley W, Mortimer P & Smith J (1961) Characteristic lesions of facial eczema produced in sheep by dosing material containing *P. chartarum* collected from pasture. *New Zealand J. Agr. Res.*, **4**:552-59
- Cullen N, Morris C, Hickey S & Henderson H (2011) An update on genetic parameters for facial eczema susceptibility in New Zealand dairy cattle. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*, **71**:117-121.
- Cunningham I, Hopkirk C & Filmer J (1942) Photosensitivity diseases in New Zealand. I. Facial Eczema: its clinical, pathological and biochemical characterization. *New Zealand J. Sci. Tech.*, **24**:185 - 198.
- Dairy Australia FE Working Group (2013) *A Review of Facial Eczema*, Australia: Dairy Australia.
- Davoudi S (2013) Study of hepatic problems in livestock. *European J. Zoo. Res.*, **2**:124-32
- Dawson C & Laven R (2007) Failure of zinc supplementation to prevent severe facial eczema in cattle fed excess copper. *New Zealand Vet. J.*, **55**:6: 353 - 355.
- DeFrain J, Socha M, Tomlinson D, Hittmann A & McKay B (2010) Effect of feeding metal amino acid complexed trace minerals to dairy cattle for the prevention of facial eczema. *Livest. Sci.*, **129**:1-12
- Deisseroth A & Dounce A (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiological Reviews*, **50**:319 - 375.
- di Menna M, Campbell J & Mortimer P (1970) Sporidesmin production and sporulation in *Pithomyces chartarum*. *Journal of General Microbiology*, **61**:87 - 96.
- di Menna M (1977) The wash method of counting *Pithomyces chartarum* spores in pasture. *Proceedings of the Ruakura Farmer's Conference*, pp. 1 - 8.
- di Menna M & Bailey J (1973) *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. *New Zealand J. Agr. Res.*, **16**:343-351
- di Menna M, Hawkes A & Garthwaite L (1991) *Sporidesmin produced by recent P. chartarum isolates*, Hamilton: Mycotoxic Diseases Group Annual Report 1990/1991. Ruakura Agricultural Centre.
- di Menna M, Mortimer P & White E (1977) The genus *Pithomyces*. Em: M. Dekker, ed. *Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicosis, vol. 1, Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins*. New York: s.n., pp. 99 - 105.
- di Menna M, Smith B & Miles C (2009) A history of facial eczema (pithomycoxicosis) research. *New Zealand J. Agr. Res.*, **52**:345 - 376.
- Dingley J (1962) *Pithomyces chartarum*, its occurrence, morphology, and taxonomy. *New Zealand J. Agr. Res.*, **5**:49 - 61.
- Dingley J, Done J, Taylor A & Russell D (1962) The production of sporidesmin and sporidesmolides by wild isolates of *P. chartarum* in surface and in submerged culture. *J. Gen. Microbio.*, **29**:127 - 135.
- Dir. Reg. Orden. Territ. e Rec. Híd. (2005) *Relatório do Estado do Ordenamento do Território 2003*, Açores: Direcção Regional do Ordenamento do Território e dos Recursos Hídricos.
- Dodd D (1959) The pathology of facial eczema. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*, **19**:48 - 52.

- Dodd D (1960) Photosensitivity diseases in New Zealand XXI. The susceptibility of the rabbit to facial eczema. *New Zealand J. Agr. Res.*, **3:3**:491 - 497.
- Donaghys (2013) *Donaghys-PerformanceFirst*. [Online] [Acedido em 4 5 2015].
- Done J, Mortimer P & Taylor A (1960) Some observations on field cases of eczema facial: liver pathology and determinations of serum bilirubin, cholesterol, transaminase and alkaline phosphatase. *Res. Vet. Sci.*, **1**:76-83.
- Done J, Mortimer P & Taylor A (1961) The production of sporidesmin and sporidesmolides by *Pithomyces chartarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **26**:207 - 222.
- Done J, Mortimer P & Taylor A (1962) The experimental intoxication of sheep with sporidesmin, a metabolic product of *P. chartarum*. II. Changes in some serum constituents after oral administration of sporidesmin. *Res. Vet. Sci.*, **3**:161 - 171.
- Duncan E, Dodds K, Henry H, Thompson M & Phua S (2007) Cloning, mapping and associations studies of the ovine ABCG2 gene with facial eczema disease in sheep. *Animal Genetics*, **38**:126 - 131.
- Duncan E, Thompson M & Phua S (2005) Zinc protection of HepG2 cells from sporidesmin toxicity does not require de novo gene transcription. *Toxicology Letters*, **159**:164 - 172.
- Eakins M (1978) The effect of three triterpene acids and sporidesmin on the enzyme activities of rat liver plasma membranes. *Chem. Biol. Interact.*, **21**:117-124.
- Edwards J, Richards R, Gwynn R & Love R (1981) A facial eczema outbreak in sheep. *Aust. Vet. J.*, **57**:392-94
- EFSA - CONTAM (2012) Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, **10**:7:158.
- Ellis M (1960) Dematiaceous hyphomycetes I. *Mycol. Pap.*, **76**:13 - 15.
- Evans J, McFarlane D, Reid C & Perrin D (1957) *N. Z. J. Sci. Tech.*, **38**:4:491.
- Fairclough R, Sissons C, Holland P & Ronaldson J (1978) Studies on sporidesmin metabolism in sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **38**:65 - 70.
- Fairclough R & Smith B (1983) Sporidesmin concentration in the bile of sheep resistant or susceptible to sporidesmin dosing. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **43**:213 - 215.
- FAO Food and Nutrition Paper No. 81 (2004) *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003*, s.l.: s.n.
- Farmer Levies (2011) *Facing Up to Facial Eczema*, New Zealand: Farmer Levies.
- Faull B (1991) Prevalence and costs of facial eczema on dairy farms. *Surveillance Vol. 18 No. 2*, p. MAF Biosecurity Authority.
- Ferguson L, Berriman J, Pearson A, Munday R, Fowke E & Towers N (1992) *In vitro* and *in vivo* mutagenicity studies on sporidesmin, the toxin associated with facial eczema in ruminants. *Mutation Research*, **268**:199 - 210.
- Fisher M & Mellor D (2008) Developing a systematic strategy incorporating ethical, animal welfare and practical principles guide the genetic improvement of dairy cattle. *New Zealand Vet. J.*, **56**:3:100-06
- Fitzgerald J, Collin R & Towers N (1995) Biological control of sporidesmin-producing strains of *P. chartarum* by biocompetitive exclusion. Em: *Toxicology and Food Safety Research Report*. Hamilton: AgResearch, pp. 26 - 27.

- Fitzgerald J, Collin R & Towers N (1998) Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Applied Microbiology*, **26**:17 - 21.
- Flaoyen A, Borrebaek B & Nordstoga K (1991) Glycogen accumulation and histological changes in the livers of lambs with alveld and experimental sporidesmin intoxication. *Vet. Res. Comm.*, **15**:443-53
- Flaoyen A & Smith B (1992) Parenchymal injury and biliary obstruction in relation to photosensitization in sporidesmin-intoxicated lambs. *Vet. Res. Comm.*, **16**:337 - 344.
- Flayoen A, Smith B & Miles C (1993) An attempt to reproduce crystal-associated cholangitis in lambs by the experimental dosing of sarsasapogenin or diosgenin alone and in combination with sporidesmin. *New Zealand Vet. J.*, **41**:171 - 174.
- Gallagher C (1964a) Skin lesion of sheep caused by sporidesmin. *Nature*, **201**:1293 - 1294.
- Gallagher C (1964b). The effect of sporidesmin on liver enzyme systems. *Bioch. Phar.*, **13**:1017-1026.
- Gallo A, Giuberti G, Frisvad J, Bertuzzi T & Nielsen K (2015) Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, **7**:3057-3111.
- Glenn B, Panciera R & Monlux A (1965) A hepatogenous photosensitivity disease of cattle. II. histopathology and pathogenesis of the hepatic lesions. *Path. Vet.*, **2**: 49 -67.
- Glenn B, Monlux A & Panciera R (1964) A hepatogenous photosensitivity disease of cattle. I. Experimental production and clinical aspects of the disease. *Path. Vet.*, **1**:469 - 484.
- Grace N, Munday R, Thompson A, Towers N, O'Donnell K, McDonald R, Stirnemann M & Ford A (1997) Evaluation of Intraruminal Devices for Combined Facial Eczema Control and Trace Element Supplementation in Sheep. *New Zealand Vet. J.*, **45**:6:236 - 238.
- Greenwood P & Williamson G (1985) An outbreak of facial eczema in sheep. *Australian Vet. J.*, **62**:2:65-66.
- Gregory P & Lacey M (1964) The discovery of *Pithomyces chartarum* in Britain. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **47**:25-30.
- Halder C, Taber R & Camp B (1979) High-performance liquid chromatography of the mycotoxin, sporidesmin, from *Pithomyces chartarum*. *Journal of Chromatography*, **175**:356 - 361.
- Handcock B (2012) *Cambridge Veterinary Services*. [Online] Available at: <http://cambridgevets.co.nz/Farm+Animal+Services/Farm+Animal+Information.html> [Acedido em 21 Agosto 2015].
- Hansen D, McCoy R, Hedstrom O, Snyder S, Ballerstedt P (1994) Photosensitisation associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **204**:1668 - 1671.
- Harris B (2005) Breeding dairy cows for the future in New Zealand. *New Zealand Vet. J.*, **53**:6:384 - 389.
- Haware M & Sharma N (1973) A new glume blotch of rice (*Oryza sativa*). *Plant Disease Reporter*, **57**:436-37
- Henderson W, Miles C & Nicholson B (1995) Identification of zinc and cadmium complexes of the mycotoxin Sporidesmin A by electro mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 889 - 890.
- Hohenboken W, Morris C, Munday R, DeNicolo G, Amyes N, Towers N & Phua S (2004) Antioxidants in blood from sheep lines divergently selected for facial eczema resistance. *New Zealand J. Agr. Res.*, **47**:119-127.

- Hohenboken W, Robertson J, Blodgett D, Morris C & Towers N (2000) Sporidesmin-induced mortality and histological lesions in mouse lines divergently selected for response to toxins in endophyte-infected fescue. *Journal of Animal Science*, **78**:2157 - 2163.
- Hove E & Wright D (1969) Casein, phosphopeptones and phosphoserine protect rats against the mycotoxin, sporidesmin. *Life Sciences*, **8**: 545 - 550.
- Hum S (2005) Putative sporidesmin toxicity in an Eastern Grey kangaroo (*Macropus giganteus*). *Australian Veterinary Journal*, **83**:11: 678 - 679.
- International Agency for Research on Cancer (2015) *International Agency for Research on Cancer*. [Online] Available at :<http://www.iarc.fr/> [Acedido em 31 8 2015].
- IPMA (2015) *IPMA* [Online] Available at:<https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/> [Acedido em 25 8 2015].
- Janes B (1959) *Sporidesmium bakeri* recorded from Victoria, Australia. *Nature*, **184**: 1327.
- Jordan T (1986) Use of indirect immunofluorescence to show changes in liver actin microfilament staining in inbred mice strains exposed to the mycotoxin sporidesmin. *Liver*, **6**:78 - 84.
- Kellerman T & Coetzer J (1984) *Hepatogenous photosensitivity diseases in South Africa*, Onderstepoort: Veterinary Research Institute.
- Kellerman T & Coetzer J (1985) Hepatogenous diseases in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **52**:157-73
- Kellerman T, van der Westhuizen G, Coetzer J, Roux C, Marasas W, Minne J, Bath G & Basson P (1980) Photosensitivity in South Africa II. The experim. prod. of the ovine hepatogenous photosensitivity disease geeldikkop (*Tribulosis ovis*) by yhe simultaneous ingest. of *Tribulus terrestris* plants and cult. of *P. chartarum* containing the mycot. sporidesmin. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **47**:231-261.
- Keogh R (1973) *P. chartarum* spore distribution and sheep grazing patterns in relation to urine-patch and inter excreta sites within ryegrass-dominant pastures. *New Zealand J. Agr. Res.*, **16**:3:353 - 355.
- Krogh P (1969) The pathology of mycotoxins. *J. stored Prod. Res.*, **5**:259-264.
- Krogh P (1978) Mycotoxicoses of Animals. *Mycopathologia*, **65**:43-45.
- Kroker R, Anwer M & Hegner D (1977) Effect of sporidesmin on bile acid metabolism in isolated rat hepatocytes. *Zbl. Vet. Med.*, **24**:205 - 209.
- Lacey J (1975) Airborne spores in pasture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **64**:265 - 281.
- Lacey M & Gregory P (1962) Occurrence in Britain of the fungus causing facial eczema in sheep. *Nature*, **193**:185
- Le Bars J & Le Bars P (1996) Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Ves. Res.*, **27**:383 - 394.
- Le Bars J, Oswald E, LeBars P, Bonnefoi M, Bézille P & Braun J (1990) Ecotoxigenesis of *Pithomyces chartarum*. *Food Additives and Contaminants*, **7**:19 - 21.
- Loong P, Jordan T, Wheeler T, Ford H & Campbell A (1986) Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to detect plasma protein variation between Romney sheep selected for facial eczema resistance or susceptibility. *New Zealand J. Agr. Res.*, **29**:449 - 456.

- Mackinnon M & Te Punga W (1961) Pathological effects of feeding *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis to guinea-pigs. *New Zealand J. Agr. Res.*, **4**:1:141 - 146.
- Marbrook J (1964) The microestimation of sporidesmin. *New Zealand J. Agr. Res.*, **7**:596 - 602.
- Marbrook J & Matthews R (1962) Loss of sporidesmin from spores of *Pithomyces chartarum* (Berck & Curt) M. B. Ellis. *New Zealand J. Agr. Res.*, **5**:223 - 236.
- McFarlane D, Evans J & Reid S (1959) Photosensitivity diseases in New Zealand. XIV The pathogenesis of facial eczema. *New Zealand J. Agr. Res.*, **2**:194 - 200.
- McMillan W, Dockrill G & Towers N (1988) Sporidesmin poisoning in ewes in late pregnancy. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **48**:131 - 134.
- Middleton M (1974) The involvement of the disulphide group of sporidesmin in the action of the toxin on swelling and respiration of liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, **23**: 811 - 820.
- Mitchell K, Thomas R & Clarke R (1961) Factors influencing the growth of *Pithomyces chartarum* in pasture. *New Zealand J. Agr. Res.*, **4**:5-6:566 - 577.
- Mitchell K, Walshe T & Robertson N (1959) The weather conditions associated with outbreaks of facial eczema. *New Zealand J. Agr. Res.*, **2**:548 - 604.
- Morris C, Amyes N, Towers N & Wesselink C (1999) Correlated responses to selection for or against facial eczema susceptibility in Romney sheep in New Zealand. *New Zealand J. Agr. Res.*, **42**:475 - 481.
- Morris C, Burton L, Towers N, Cullen G, Rendel J & Johnson D (1998) Genetics of susceptibility to facial eczema in Frisian and Jersey cattle. *New Zealand J. Agr. Research*, **41**:347 - 357.
- Morris C, Hickey S & Denicolo G (2002a) Lifetime survival of Jersey-sired cows following natural challenge with facial eczema during first lactation. *New Zealand J. Agr. Res.*, **45**:165 - 170.
- Morris C, Jordan T, Loong P, Lewis M & Towers (1988) Associations between transferrin type and facial eczema susceptibility and some production traits in sheep. *New Zealand J. Agr. Res.*, **31**:301 - 305.
- Morris C, Phua S, Cullen N & Towers N (2013) Review of genetic studies of susceptibility to facial eczema in sheep and dairy cattle. *New Zealand J. Agri. Res.*, **56**:156 - 170.
- Morris C, Smith B & Hickey S (2002b) Relationship between sporidesmin-induced liver injury and serum activity of gamma-glutamyltransferase in Romney lambs sired by facial eczema-resistant or control rams. *New Zealand Vet. J.*, **50**:1:14 - 18.
- Morris C, Towers N, Campbell A, Meyer H, Wesselink C & Wheeler M (1989) Responses achieved in Romney flocks selected for or against susceptibility to facial eczema, 1975 - 1987. *New Zealand J. Agr. Res.*, **32**:379 - 388.
- Morris C, Towers N, Hohenboken W, Maqbool N, Smith B & Phua S (2004) Inheritance of resistance to facial eczema: a review of research findings from sheep and cattle in New Zealand. *New Zealand Vet. J.*, **52**:5:205 - 215.
- Morris C, Towers N, Smith B & Southey B (1991a) Progeny testing bulls for susceptibility to facial eczema. *New Zealand J. Agr. Res.*, **34**:413 - 417.
- Morris C, Towers N & Tempero H (1991b) Breeding for resistance to facial eczema in dairy cattle. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, **53**:221 - 224.

- Morris C, Towers N, Tempero H, Cox N & Henderson H (1990) Facial eczema in Jersey cattle: heritability and correlation with production. *Proc. New Zealand Soc. An. Prod.*, **50**:255 - 259.
- Morris C, Towers N, Wesselink C & Southey B, (1991c). Effect of facial eczema on ewe reproduction and postnatal lamb survival in Romney sheep. *New Zealand J. Agr. Res.*, **34**:4:407 - 412.
- Morris C, Towers N, Wesselink C & Wheeler M (1994) Selection for or against facial eczema susceptibility in sheep. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*,**54**:263-266.
- Morris C, Towers N, Wheeler M & Wesselink C (1995) Selection for or against facial eczema susceptibility in Romney sheep, as monitored by serum concentrations of a liver enzyme. *New Zealand J. Agr. Res.*,**38**:211-219.
- Morris C, Wesselink C, Wilson J, DeNicolo G & Towers N (2001) Susceptibility to facial eczema in lambs sired by East Friesian, Romney control, and Romney facial eczema resistant rams. *New Zealand J. Agr. Res.*, **44**: 47 - 52.
- Mortimer P & Taylor A (1962) The experimental intoxication of shepp with sporidesmin, a metabolic product of *Pithomyces chartarum* I. Clinical observations and findingsat post-mortem examinations. *Research in Neterinary Science*, **3**:147 - 160.
- Mortimer P (1962) The experimental intoxication of sheep with sporidesmin; a metabolic product of *Pithomyces chartarum*. III Some changes in cellular components and coagulation properties of the blood, in serum and in the liver function. *Res. Vet. Sci.*, **3**:269 - 286.
- Mortimer P (1963) The experimental intoxication of sheep with sporidesmin, a metabolic product of *Pithomyces chartarum*, IV: histological and histochemical examinations of orally-dosed sheep. *Res. Vet. Scie.*,166-1854.
- Mortimer P (1970) The toxic effects of sporidesmin on mice. *New Zealand J. Agr. Res.*, **13**: 437 - 447.
- Mortimer P & Collins B (1968) The *in vitro* toxicity of sporidesmins and related compounds to tissue-culture cells. *Rest. Vet. Sci.*, **9**:136 - 141.
- Mortimer P & Stanbridge T (1968) The excretion of sporidesmin given by mouth to sheep. *J. Comp. Path.*,**78**:505 - 512.
- Mortimer P & Stanbridge T (1969) Changes in biliary secretion following sporidesmin poisoning in sheep. *Journal Comparative Pathology*, **79**:267 - 274.
- Mostrom M & Jacobsen B (2011) Ruminant mycotoxicosis. *Vet. Clin. Food Anim.*, **27**:315-344.
- Mota A, Martinez M & Coutinho L (2000) Localização de Locos Gênicos de Características Quantitativas (QTLs) em Gado de Leite. Premissas e Estratégias. *Multiciências*, **4**:1:18-37.
- Mulvaney C (2011) *AgriNetworks*. New Zealand, s.n.
- Munday R (1982) Studies on the mecanism of toxicity of the mycotoxin, sporidesmin, I: generation of superoxide radical by sporidesmin. *Chem-Biol Interactions*, **41**:361 - 374.
- Munday R (1985) Studies on the mechanism of toxicity of the mycotoxin sporidesmin.*J. Appl. Tox.*,**5**:69-73
- Munday R (1987) Studies on the mechanism of toxicity of the mycotoxin, sporidesmin. V Generation of hydroxyl radical by sporidesmin. *J. Appl. Tox.*, **7**:17 - 22.
- Munday R (1989) Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radical Biology and Medicine*, **7**:659 - 673.

- Munday R (1984a) Studies on the mechanism of toxicity of the mycotoxin sporidesmin. 2- Evidence for intracellular generation of superoxide radical from sporidesmin. *J. Appl. Tox.*, **4**:182 - 186.
- Munday R (1984b) Studies on the mechanism of toxicity of the mycotoxin sporidesmin. 3- Inhibition by metals of the generation of superoxyde radical by sporidesmin. *J. Appl. Tox.*, **4**:182 - 186.
- Munday R & Manns E (1989) Protection by iron salts against sporidesmin intoxication in sheep. *New Zealand Vet. J.*, **37**:65 - 68.
- Munday R, Manns E & Mortimer P (1983) Effect of antioxidants on the toxicity of the facial eczema toxin, sporidesmin, in sheep. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*, **43**:209 - 212.
- Munday R, Pearson A & Ferguson L (1993) Mouse micronucleus assays of sporidesmin, the toxin associated with facial eczema in ruminants. *Mutation Research*, **302**:71 - 74.
- Munday R, Thompson A, Smith B, Towers N, O'Donnell K, McDonald R & Stirnemann M (1997) A zinc-containing intraruminal device for facial eczema control in lambs. *New Zealand Vet. J.*, **45**:93 - 98.
- Munday R, Thompson A, Smith B, Towers N, O'Donnell K, McDonald R & Stirnemann M (2001) A zinc-containing intraruminal device for prevention of the sporidesmin-induced cholangiopathy of facial eczema in calves. *New Zealand Vet. J.*, **49**:1:29 - 33.
- Naturalis E (2015) *Catalogue of Life*. [Online] Available at: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/17435205> [Acedido em 26 8 2015].
- Oldman L & di Menna M (1983) *Facial Eczema Predicting Danger Periods*, Hamilton: Ministry of Agriculture and Fisheries.
- Ozmen O, Sahinduran S, Haligur M. & Albay M (2008) Clinicopathological studies on facial eczema outbreak in sheep in southest Turkey. *Trop. Anim. Health Prod.*, **40**:545 - 551.
- Parkinson T, Vermunt J & Malmo J (2010). *Diseases of Cattle in Australasia*. New Zealand: VetLearn.
- Parle J & di Menna M (1968) Fungicides and control of *P. chartarum*. *Proc. Ruakura Farmer's Conference Week*, pp.141-147.
- Parle J, Margaret E & di Menna (1972) Fungicides and the control of *P. chartarum*. *New Zealand J. Agr. Res.*, **15**:1:54 - 63.
- Percival J (1959a) Photosensitivity diseases in New Zealand XVII. The association of *Sporidesmium bakeri* with facial eczema. *New Zealand J. Agr. Res.*, **2**:5:1041 - 1056.
- Percival J (1959b) The association of *Sporidesmium bakeri* with facial eczema. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*, **19**:77-82.
- Peters A (1966.)Effect of sporidesmin on lipid metabolism in rabbits. *Nature*, **7**:601 - 603.
- Peters J (1963) Mechanisms of early sporidesmin intoxication in sheep. *Nature*, **200**:286.
- Peters J & Mortimer P (1970) Sporidesmin poisoning in sheep. The effects on lipid and bile metabolism as reflect in serum. *Res. Vet. Sci.*, **11**:183 - 188.
- Phua S, Brauning R, Baird H & Dodds K (2014b) Identifying chromosomal selection-sweep regions in facial eczema selection-line animals using an Ovine 50K-SNP Array. *Animal Genetics*, **45**:240 - 247.
- Phua S, Dodds K, Morris C, Henry H, Beattie A, Garmonsway H, Towers N & Crawford A (2008) A genome-screen experiment to detect quantitative trait loci affecting resistance to facial eczema disease in sheep. *Animal Genetics*, **40**:73-79.

- Phua S, Dodds K, Morris C, Paterson K, McEwan J, Garmonsway H, Towers N & Crawford A (1999) Catalase gene is associated with facial eczema disease resistance in sheep. *Animal Genetics*,**30**:286-295.
- Phua S, Dodds K, Morris C, Towers N & Crawford A (1998) Antioxidant enzyme as candidate genes for disease resistance in sheep facial eczema. *Proceedings of the Sixth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, **27**:273 - 276.
- Phua S, Hyndman D, Baird H, Auvray B, McEwan J, Lee M & Dodds K (2014a) Towards genomic selection for facial eczema disease tolerance in the New Zealand sheep industry. *Animal Genetics*,**45**:559\_64
- Pinto C, Santos V, Dinis J, Peleteiro M, Fitzgerald J, Hawkes A & Smith B (2005) Pithomycotoxicosis (facial eczema) in ruminants in the Azores, Portugal. *The Veterinary Record*,**157**:25:805 - 810.
- Quin J (1933) Studies on the photosensitization of animals in South Africa. VI. The effect of surgical obstruction of the normal bile flow. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **4**: 463 - 478.
- Quintas H, Cordeiro Â & Aguiar C (2014) *Plantas Tóxicas para Ruminantes*. Edição Especial para a Bayer ed. Lisboa: Publicações Ciência e Vida, Lda..
- Rammel C (1991) Mycotoxins in feed. *Surveillance*, **18**:1:7 - 12.
- Rasmusen B & Tucker E (1973) Tranferrin types and reproduction in sheep. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*,**4**:207 - 220.
- Regulamento (CE) 1249/2008, 2008. Regulamento 1249/2008 da Comissão de 10 de Dezembro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*, Volume 337, pp. 3 - 30.
- Regulamento de Execução 148/2014, 2014. Regulamento de Execução 148/2014 da Comissão de 17 de Fevereiro de 2014. *Jornal Oficial da União Europeia*, Volume 46, pp. 1 - 2.
- Richard J (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *International Journal of Food Microbiology* **119**:3-10.
- Riet-Correa F, Rivero R, Odriozola E, Adrien M, Medeiros R & Schild A (2013) Mycotoxicoses of ruminants and horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **XX**:X:1 - 17.
- Rimington C, Slater T, Spector W, Strauli U & Willoughby D (1962) Sporidesmin poisoning in the rat. *Nature*,**194**:1152 - 1153.
- Rodríguez A, Montossi F, Luzardo S, Banchemo G, Franchi M, Lima A & López F (2010) Aparición de brotes de intoxicación por "Hongo de la Pradera" (*Pithomyces chartarum*) em Bovinos para Carne. *Revista INIA*, **21**:16 - 19.
- Roux C (1986) *Leptosphaerulina chartarum* sp. nov., the teleomorph of *Pithomyces chartarum*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **86**:2:319 - 323.
- Russel G (1960) Detection and estimation of a facial eczema toxin, sporidesmin. *Nature*, **186**:788 - 789.
- Russomanno O, Portugal M, Coutinho L, Calil E & Figueiredo M (2003) *Leptosphaerulina chartarum* (= *P. chartarum*) e seu envolvimento no eczema facial. *Arq. Inst. Biol.*, **70**:3:385 - 390.
- Scheie E, Flaoyen A, Moan J & Berg K (2002) Phylloerythrin: mechanisms for cellular uptake and location, photosensitisation and spectroscopic evaluation. *New Zealand Vet. J.* **50**:3:104 - 110.
- Scheie E, Smith B, Cox N & Flaoyen A (2003) Spectrofluorometric analysis of phylloerythrin (phytoporphyrin) in plasma and tissues from sheep suffering from facial eczema. *New Zealand Vet. J.*, **51**:104 - 110.

- Scott J (1989) *Fifty years of research and recreation at Ruakura*. Ruakura Agricultural Centre, Ministry of Agriculture and Fisheries, Hamilton, New Zealand: MAF Tech North.
- Seixas J (2009) Diferenciação das intoxicações por *Brachiaria* spp. e *Pithomyces chartarum* através dos aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e toxicológicos, Tese de Doutorado em Medicina Veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.
- Seixas, Pinto C & Peixoto P (2007) Fotosensibilidade em ruminantes em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias - Suplemento*, **102**:377- 399.
- Sinclair D (1961) *Pithomyces chartarum* spores on pasture and their relation to facial eczema in sheep. *New Zealand J. Agr. Res.*, **4**:492 - 503.
- Sinclair D & Howe M (1968) Effect of thiabendazole on *P. chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis. *New Zealand J. Agr. Res.*, **11**:1:59 - 61.
- Sinclair D & Parle J (1967) Thiabendazole and Facial Eczema. *Proc. Ruakura Farmer's Conference Week*, pp.160-169.
- Smeaton D, Hockey H & Towers N (1985) Effects of facial eczema on ewe reproduction and ewe and lamb live weights. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **45**:133 - 135.
- Smith B (1977) Toxicity of zinc in ruminants in relation to facial eczema. *New Zealand Vet. J.*, **25**:310-312.
- Smith B (2000) Effects of low dose rates of sporidesmin given orally to sheep. *New Zealand Vet. J.*, **48**:176-81
- Smith B, Asher G, Thompson K & Hoggard G (1997) Hepatogenous photosensitisation in fallow deer (*Dama dama*) in New Zealand. *New Zealand Vet. J.*, **45**:88 - 92.
- Smith B, Coe B & Embling P (1978) Protective effect of zinc sulphate in a natural facial eczema outbreak in dairy cows. *New Zealand Vet. J.*, **26**:12:314 - 315.
- Smith B, Collier A, Lawrence R & Towers N (1984) Hypocalcaemia associated with high dose rates of zinc oxide to lactating dairy cows. *New Zealand Vet. J.*, **32**:48 - 50.
- Smith B & Embling P (1991) Facial Eczema in goats: the toxicity of sporidesmin in goats and its pathology. *New Zealand Vet. J.*, **39**: 18 - 22.
- Smith B & Embling P (1999) Effect of prior sporidesmin intoxication on the pancreopathy associated with zinc oxide toxicity. *New Zealand Vet. J.*, **47**:25 - 27.
- Smith B, Embling P & Gravett I (1987) *P. chartarum* spore counts in rumen contents and faeces of sheep exposed to autumn pasture at three different grazing pressures. *J. Appl. Tox.*, **7**:3:179 - 184.
- Smith B, Embling P & Pearce M (1983) Zinc sulphate in the drinking water of lactating dairy cows for facial eczema control. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **43**:217 - 219.
- Smith B, Embling P, Towers N, Wright D & Payne E (1977) The protective effect of zinc sulphate in experimental sporidesmin poisoning of sheep. *New Zealand Vet. J.*, **25**:124 - 127.
- Smith B, Grace N, West D & Balemi S (2010) The impact of high zinc intake on the copper status of dairy cows in New Zealand. *New Zealand Vet. J.*, **58**:142-45.
- Smith B & O'Hara P (1978) Bovine photosensitization in New Zealand. *New Zealand Vet. J.*, **26**:2 - 5.
- Smith B & Payne E (1991) Adrenal associated changes in experimental sporidesmin poisoning of sheep. *New Zealand Vet. J.*, **39**:46 - 49.

- Smith B, Standbridge T. & Embling P (1980) Sheep breed differences in pentobarbitone sleeping-time and response to experimental sporidesmin intoxication. *New Zealand Vet. J.*, **28**: 35 - 36.
- Smith B & Towers N (1984) Pithomycotoxicosis (facial eczema) in New Zealand and the use of zinc salts for its prevention. Em: *Australia - USA Poisonous Plants Symposium, Brisbane*. Queensland: Seawright, pp. 70 - 79.
- Smith B & Towers N (2002) Mycotoxicoses of grazing animals in New Zealand. *New Zealand Vet J.* **50**:28-34
- Smith J, Crawley W & Lees F (1961) Seasonal variation in spore numbers of *Pithomyces chartarum* in 1960 and 1961 in the Waitako. *New Zealand J. Agr. Res.*, **4**:538 - 551.
- Smith J, Lees F & Crawley W (1963) Facial eczema on long and short herbage. *New Zealand J. Agr. Res.*, **6**:6:518 - 525.
- Southey C, Squire J, Morris C & Towers N (1986) Using facial eczema resistant rams is feasible. *Proceedings of the Ruakura Farmer's Conference*, pp. 109 - 113.
- SREA (2015) *Serviço Regional de Estatísticas Açores*. [Online] Available at: [http://estatistica.azores.gov.pt/conteudos/Relatorios/lista\\_relatorios.aspx?idc=307&lang\\_id=1](http://estatistica.azores.gov.pt/conteudos/Relatorios/lista_relatorios.aspx?idc=307&lang_id=1) [Acedido em 26 Agosto 2015].
- Srinivasan U, Bala A, Jao S, Starke D, Jordan T & Mielay J. (2006) Selective inactivation of glutaredoxin by sporidesmin and other epidithiopiperazinediones. *Biochemistry*, **45**:8978 - 8997.
- Synge R & White E (1959) Sporidesmin: A substance from *Sporidesmin bakeri* causing lesions characteristic of facial eczema. *Chem. Ind.*, 1546-1547.
- Synge R & White E (1960) Photosensitivity diseases in New Zealand. XXIII. Isolation of sporidesmin, a substance causing lesions characteristic of facial eczema, from *Sporidesmium bakeri*, SYD. *New Zealand J. Agr. Res.*, **3**:907-921.
- Taber R, Pettit R, Taber W & Dollahite J (1968) Isolation of *P. chartarum* in Texas. *Mycologia*, **60**:727-730.
- Tadepalli S, Narayanan S, Stewart G, Chengappa M & Nagaraja T (2009) *Fusobacterium necrophorum*: A ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe*, **15**:6 - 43.
- Taranaki Veterinary Centre (2015) *Taranaki Veterinary Centre*. [Online] [Acedido em 11 5 2015].
- Taylor A (1971) The toxicology of sporidesmins and other epipolythiadioxopiperazines. Em: *Microbial Toxins, vol. 7, Algal and Fungal Toxins*. New York: Academic Press, pp. 337 - 376.
- Thilsing-Hansen T. & Jorgensen R (2001) Serum calcium response following oral zinc oxide administration in dairy cows. *Acta. Vet. Scand.*, **42**:271 - 278.
- Thompson K, Lake D & Cordes D (1979) Hepatic Encephalopathy Associated with Chronic Facial Eczema. *New Zealand Vet. J.*, **27**:10:221 - 223.
- Thornton R & Percival J (1959) A hepatotoxin from *Sporodesmium bakeri* capable of producing facial eczema diseases in sheep. *Nature*, **183**:63.
- Thorton R & Sinclair D (1960) Some observations on the occurrence of *Sporidesmin bakeri* and facial eczema in the field. *New Zealand J. Agr. Res.*, **3**:300 - 313.
- Towers N (1977) Effect of zinc on the toxicity of the mycotoxin sporidesmin to the rat. *Life Sci.*, **20**:413- 18.
- Towers N (1978) The incidence of subclinical Facial Eczema in selected Waitako Dairy Herds. *New Zealand Vet. J.*, **26**:142 - 145.

- Towers N (2006) Mycotoxin poisoning in grazing livestock in New Zealand. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*, **66**:300-306.
- Towers N, Meyer H, Campbell A & Southey C (1983) Development of a performance test for the selection of rams having facial eczema tolerant progeny. *Proc. New Zealand Soc. Ani. Prod.*, **43**:221-223.
- Towers N, Morris C & Southey C (1990). Breeding for Facial Eczema Resistance in Sheep. *Proceedings of the Australian Association of Animal Breeding and Genetics*, **8**:183 - 186.
- Towers N & Smith B (1978) The protective effect of zinc sulphate in experimental sporidesmin intoxication of lactating dairy cows. *New Zealand Vet. J.*, **26**:199-202.
- Towers N & Smith B (1984) *Facial Eczema. Zinc dosing for prevention. Revised recommendations*, Wellington: Ministry of Agriculture and Fisheries.
- Towers N & Stratton G (1978) Serum gamma-glutamyl-transferase as a measure of sporidesmin-induced liver damage in sheep. *New Zealand Vet. J.*, **26**:109-112.
- Towers N, Young P & Wright D (1981) Effect of zinc supplementation on bovine plasma copper. *New Zealand Vet. J.*, **29**:113 - 114.
- Ueno K, Giam C & Taber W (1974) Absence of sporidesmin in a Texas isolate of *Pithomyces chartarum*. *Mycologia*, **66**:360 - 362.
- Upreti G, Riches P, Morris C & Gravett I (1991) Prediction of resistance/susceptibility to facial eczema, a hepatotoxic disease of sheep, by studies of erythrocyte membranes. *Biomembranes in Health and Disease*, **1**:52-60.
- UTAD (2015) *UTAD Jardim Botânico*. [Online] Available at: <http://jb.utad.pt/> [Acedido em 27 8 2015].
- Van der Graaf R (1998) *Facial eczema of sheep and cattle*, Victoria: State of Victoria.
- Van der Wuijckhuise L, Snoep J, Cremers C, Duvivier A, Grieneveld A, Ottens W & Van der Sar S (2006) First case of Pithomycototoxicosis (facial eczema) in the Netherlands. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, **131**:858 - 861.
- Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Branyi N & Tóth B (2015) Aspergillus Mycotoxins. Em: R. Russell, M. Paterson & N. Lima, edits. *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. s.l.:CRC Press, pp. 165 - 179.
- Wallace E (1976) A comparison of the control of *P. chartarum* with three fungicides applied at both pre- and post-damage levels of spores in pasture. *New Zealand J. Exp. Agr.*, **4**:2:243-247.
- Waring P, Egan M, Braithwaite A, Mullbacher A & Sjaarda A (1990) Apoptosis induced in macrophages and T blasts by the mycotoxin sporidesmin and protection by Zn<sup>2+</sup> Salts. *Int.J. Immunol.* **12**:4:445-457
- White E, Mortimer & di Menna M (1977) Chemistry of Sporidesmins. Em: M. Dekker, ed. *Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicosis, vol. 1, Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins*. New York: s.n., pp. 427 - 448.
- Woloshuk C & Shim (2013) Aflatoxins, fumosins, trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**: 94 - 109.
- Woodcock J, Henderson W & Miles C (2001a) Metal complexes of the mycotoxins sporidesmin A and gliotoxin, investigated by electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Inorg. Biochem.*, **85**:187-199.

- Woodcock J, Henderson W, Miles C & Nicholson B (2001b). Metal complexes of sporidesmin D and dimethylgliotoxin, investigated by electrospray mass spectrometry. *J. Inorg. Bioch.*, **84**:225-232.
- Worker N (1960) A hepatotoxin causing liver damage in facial eczema of sheep. *Nature*, 909 - 910.
- Wright D & Forrester I (1965) Some biochemical effects of sporidesmin. *Canada J. Bioch.*, **43**:881 - 888.
- Yu B (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physio. Rev.*, 74:139 - 162.
- Zain M (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Jour. of Saudi Chem. Soc.*, **15**:129-144.