

# Perfil leucocitário de frangos de corte tratados com ocratoxina A

## Leucocytes of broilers chickens treated with ochratoxin A

Marcos de Assis Moura,\* Carlos Henrique Machado,\*\* Elizabeth Bernardo Ballesteiro Pereira,\*\* Lenir Cardoso Porfírio,\*\*\* Patrícia Riddell Millar,\*\*\*\* Leila Gatti Sobreiro,\*\*\*\*\* Maria Regina Reis Amendoeira,\* Ronald Bastos Freire\*\*

### Resumo

Alterações leucocitárias provocadas pela administração única de baixa dose de ocratoxina A foram avaliadas em 120 pintos de um dia da linhagem comercial de corte Hiyeld/Rezende. Os animais foram separados em três grupos experimentais: grupo 1 (n=40) sem tratamento; grupo 2 (n=40) tratado com 40mg/Kg ocratoxina A e grupo 3 (n=40) tratado com solução salina tamponada. As amostras de sangue foram obtidas e analisadas no dia da aplicação, aos sete, 14 e 21 dias de vida. Foi observada uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) de leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) nas aves tratadas com ocratoxina A, caracterizando toxidez aguda decorrente da exposição à baixa dose da micotoxina em aves neonatas, após uma única exposição.

*Palavras-chave:* hematologia, leucócitos de aves, ocratoxina A.

### Abstract

Leucocytes dysfunction caused by the administration of a single low dose of ochratoxin A (OTA) was evaluated in 120 one day old chicks from broiler line HIYIELD/REZENDE. The study was carried out in three groups of animals: group 1 (n=40) with treated animals; group 2 (n=40) with animals treated with OTA and group 3 (n= 40), which received a phosphate buffered saline (PBS). Blood samples were obtained and analyzed in the same day of inoculation, and at seven, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days old. A significant reduction of mononuclear leukocytes was observed in the birds treated with OTA, suggesting an acute toxicity as a result of the exposure to a single low dose of OTA in neonatal chicks.

*Keywords:* hematology, avian leucocytes, Ochratoxin A.

### Introdução

Micotoxinas são metabólitos fúngicos, heterogêneos na sua natureza química, com ações farmacológicas variadas, que podem causar danos a animais, resultando na diminuição do desempenho e em lesões patológicas sérias. Nos últimos anos, as micotoxicoses vêm recebendo atenção especial em todo o mundo, devido às perdas econômicas crescentes. Afetam taxa de crescimento, conversão alimentar e eficiência reprodutiva do plantel, com repercussões sobre a relação custo-benefício das indústrias avícolas (Jelinek et al., 1989; Santin et al., 2001).

As intoxicações, em sua maioria, são decorrentes da ingestão acidental de pequenas quantidades de xenobióticos fúngicos, resultando em declínio mensurável do desempenho produtivo e em alterações clínicas que, embora inespecíficas, estão relacionadas com a ocorrência de hemorragias subcutâneas e imunossupressão (Giambone et al., 1985).

A ocratoxina A (OTA) é um pentapeptídeo derivado da isocumarina e da L-b-fenilalanina, produzido sob a forma de metabólito secundário por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Pitt, 2000a; Pitt, 2000b). Sua denominação foi definida por ter sido isolada pela primeira vez, como produto xenobiótico, de cultivares de *Aspergillus ochraceus* (Studer-Kohr et al., 1995).

Segundo Studer-Kohr et al. (1995) o efeito nefrotóxico da OTA já foi demonstrado, existem evidências de que as diferentes espécies animais possuem sensibilidades variáveis.

Também são atribuídos à OTA efeitos teratogênico, imunossupressor, carcinogênico (Kuiper-Goodman, 1996) e hepatotóxico (Stander et al., 2000).

Em aves, a OTA, causa depressão da hematopoiese, efeito imunossupressor sobre o timo, bursa de fabricius, baço e linfonodos (Cruz, 1996; Chang e Hamilton, 1980; Corrier, 1991). Dwivedi e Burns (1986) observaram esses efeitos em

\* Departamento de Protozoologia, Laboratório de Toxoplasmose, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

\*\* Departamento de Patologia Clínica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

\*\*\* Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

\*\*\*\* Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Doutorado) – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense (UFF).

\*\*\*\*\* Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Universidade Federal Fluminense (UFF).

Autor para correspondência: Marcos de Assis Moura. E-mail: m.a.moura@ig.com.br

exposições crônicas a doses superiores a 2 ppm, sendo mais marcantes em exposições a doses de 4 ppm.

Um estudo recentemente realizado (Moura et al., 2005) com pintos de corte de um dia da linhagem (Hiyeld/Resende) demonstrou que uma única exposição à OTA, na dose de 0,04mg/kg, por via intraperitoneal era significativa para promover significativa redução no número total de leucócitos, nas 3ª e 6ª hora que se seguiram às intoxicações. Nesse experimento, observou-se aumento nos percentuais de heterófilos e monócitos, com diminuição drástica nos percentuais relativos de linfócitos e eosinófilos, sem que houvesse alterações em relação ao percentual de basófilos circulantes (Porfírio, 2002).

Além dos danos à saúde animal, especialmente às aves e aos suínos, os estudos envolvendo a ocratoxina são extremamente importantes no que diz respeito à saúde pública, uma vez que o conhecimento dos alimentos contaminados por esta micotoxina é fundamental para a prevenção e o controle desta micotoxicose. Esta ação torna-se particularmente importante em relação à ocratoxina A, devido a seu reconhecido potencial carcinogênico, genotóxico e mutagênico para seres humanos (Krüger, 2006).

No presente trabalho, tivemos como objetivo avaliar os efeitos sobre o perfil leucocitário, em frangos de corte da linhagem comercial Hiyeld/Resende, durante os primeiros 21 dias de vida, após da administração de uma única dose de 0,04mg/kg de OTA.

## Material e métodos

Foram utilizados 120 pintos de um dia, da linhagem comercial Hiyeld/Resende, separados em três grupos experimentais: grupo 1 - controle; grupo 2 - tratados via intraperitoneal com 40mg/kg de OTA (SigmaChemical CO., St Louis, USA) diluída em solução salina tamponada (PBS); e grupo 3 - tratados via intraperitoneal com 40mg/kg de PBS; com 40 animais em cada grupo. Não houve óbitos das aves tratadas uma vez que a dose utilizada foi bastante segura, estando bem abaixo da DL50 para frangos de corte (Porfírio, 2002).

As aves foram alimentadas com ração comercial para os pintos de corte, negativa para OTA, previamente testada por cromatografia de fase líquida para a presença de micotoxinas.

As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca e transportadas sob refrigeração, conforme técnicas preconizadas por Hawkey e Dennet (1989).

Foram obtidas amostras de sangue total 10 animais de cada grupo em quatro momentos diferentes de amostragem: (1d) no primeiro dia, três horas após tratamento (AT); (2d) aos sete dias AT; (3d) aos 14 dias AT e (4d) aos 21 dias AT. Após amostragem, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical (Huff et al., 1988).

A mensuração da leucometria global (LCG) foi realizada por contagem manual, em câmara de Neubauer, utilizando a diluição de 1/100 e a observação microscópica em aumento de 400x (Feldman et al., 2000). Como diluente, foi utilizada solução de Dacie modificada, conforme recomendação para hemácias nucleadas de Blaxhall e Daisley (1973).

A identificação e a proporcionalização dos leucócitos foram realizadas em esfregaços de sangue confeccionados imediatamente após a punção, corados com Giemsa e

observados em microscopia de luz, utilizando-se aumento de 1000x segundo Feldman et al. (2000).

Aos resultados, foram aplicadas transformações de dados segundo indicações da literatura (Box, 1950; Smith et al., 1962; Gomes, 1990; Velleman e Wilkinson, 1993), após estudo preliminar a respeito das pressuposições para a análise da variância ( $p < 0,01$ ).

Usou-se delineamento inteiramente ao acaso, cujo modelo matemático foi  $Y = \mu + t_i + e_{ij}$ , no esquema fatorial 3 x 4 (grupos x dias de coleta) (Pereira, 1989; Gomes 1990; Velleman e Wilkinson, 1993). Os resultados transformados foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos foram desdobrados dentro de dias e comparados pelo teste de Tukey, através da diferença mínima significativa (Velleman e Wilkinson, 1993).

Todos os resultados foram obtidos e analisados através do programa para computador StatSoft  $\hat{\sigma}$ .

Toda a metodologia e procedimentos deste trabalho foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Nº 234/02)

## Resultados e discussão

A contagem global de leucócitos e a leucometria específica (Tabela 1) demonstraram que não houve influencia sobre o número total de leucócitos, de neutrófilos, eosinófilos e basófilos após o tratamento com OTA ( $p > 0,05$ ), em todos os dias estudados. De outro modo, observaram-se efeitos prolongados do tratamento sobre os percentuais de linfócitos e monócitos circulantes  $p < 0,01$  (Figuras 1 e 2). Segundo Abarca et al. (2001) e Bennett (2003), tais efeitos podem ser atribuídos a uma imunossupressão específica, com diminuição da proliferação de linfócitos, em razão da aplicação de OTA, corroborando com estudos de Chang e Hamilton (1980) e Corrier (1991), que citam a ocorrência, em intoxicações crônicas, de depleção do tecido linfóide no timo, baço e bursa de Fabricius, com diminuição da atividade de linfócitos B.

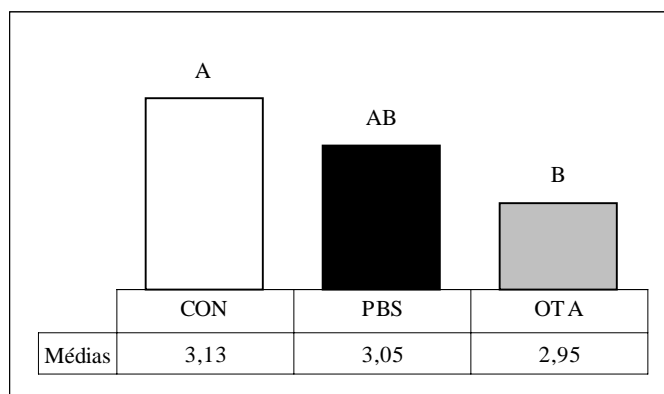
Ao se realizarem avaliações do número de monócitos circulantes nos diferentes dias após intoxicação (DAI) com OTA, observou-se uma redução numérica significativa ( $p < 0,05$ ) que prolongou-se nos 2, 3 e 4 DAI (Figura 3). Esses resultados diferem dos dados anteriormente obtidos por Porfírio (2002) que sugere que a monocitose, registrada para as primeiras horas que se seguiram à exposição, seria atribuída a uma necrose tecidual provocada pelo procedimento de administração da OTA, pela via intraperitoneal, e não pela ação estimulatória da micotoxina, resultado este confirmado mais tarde por Moura (2004), trabalhando com períodos mais longos de infecção.

Embora se atribua pouca importância à monocitopenia em aves, uma vez que estas células normalmente estão presentes em pequenas proporções na circulação, revisado por McNulty, 1991, os resultados obtidos neste estudo, por serem estatisticamente significativos ( $p < 0,01$ ) e por haverem sido reproduzidos em praticamente todos os animais, sugerem que essas células foram afetadas pela OTA. É possível que a micotoxina tenha promovido estresse metabólico em tais células que, uma vez afetadas em seus mecanismos de síntese protéica e de extrusão de quimiocinas,

**Tabela 1:** Valores médios de leucócitos, após transformação de dados, de aves tratadas com dose única de 40mg/kg ocratoxina A até o 21º após tratamento

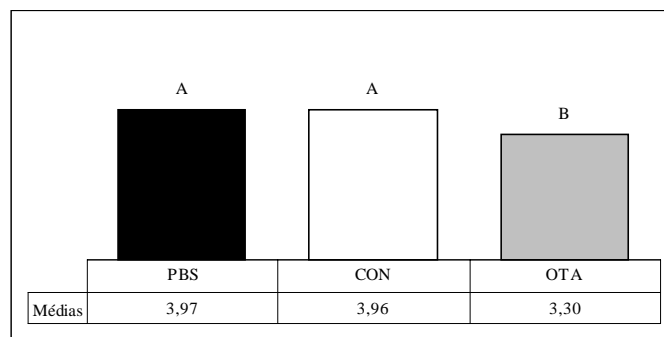
Células	Tratamentos	Dia de coleta (amostragem)				Médias
		1º dia (1d)	7º dia (2d)	14º dia (3d)	21º dia (4d)	
Leucometria Global	Controle	3,584	3,541	3,728	3,804	3,664
	PBS	3,448	3,452	3,892	3,809	3,650
	OTA	3,654	3,424	3,757	3,534	3,592
Basófilos	Controle	1,573	1,378	1,539	1,502	1,498
	PBS	1,521	1,903	1,606	1,872	1,725
	OTA	1,838	1,938	1,651	1,510	1,734
Eosinófilos	Controle	10,432	15,113	13,869	9,302	12,179
	PBS	10,831	13,301	19,493	12,037	13,915
	OTA	13,778	10,285	9,497	4,397	9,489
Heterófilos	Controle	2,750	3,250	3,046	2,331	2,844
	PBS	2,863	2,827	4,076	2,882	3,162
	OTA	3,379	2,631	2,541	1,674	2,556
Linfócitos	Controle	3,096	2,995	3,236	3,202	3,132
	PBS	2,933	3,001	2,998	3,265	3,049
	OTA	2,723	2,966	3,014	3,101	2,951
Monócitos	Controle	4,049	4,417	3,988	3,381	3,959
	PBS	3,406	4,526	3,726	4,218	3,969
	OTA	4,574	3,117	2,744	2,772	3,302

Nota: PBS= 40 mg/kg solução salina tamponada inoculada por via intraperitoneal; OTA= 40 mg/kg de ocratoxina A diluída em solução salina tamponada inoculada via intraperitoneal.

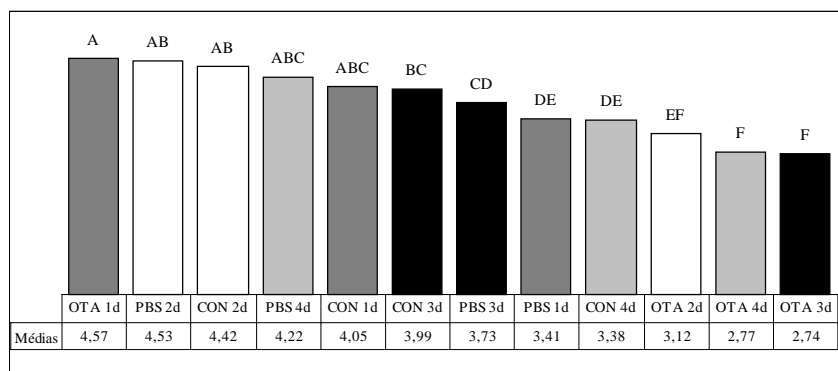


**Figura 1:** Avaliação do efeito em aves, do tratamento com OTA, através dos valores médios de linfócitos, segundo teste de Tukey (DMS =0,11031). CON - grupo controle; PBS - Aves tratadas via intraperitoneal com 40mg/kg de PBS e OTA - Aves tratadas via intraperitoneal com 40mg/kg de OTA diluída em solução salina tamponada (PBS)

seriam prejudicadas em suas atividades de ativação e regulação da proliferação de linfócitos. A redução dos fagócitos naturais sanguíneos, encontrado neste estudo, sugere que a exposição prematura a uma única dose de OTA afeta as células inflamatórias, podendo estar regulando os processos apoptogênicos celulares. Tal possibilidade, segundo estudos anteriores de Studer-Kohr et al. (1995), Kuiper-Goodman (1996) e Stander et al. (2000) não parece ser específica e explica a necrose associada a diferentes células e tecidos devido às intoxicações crônicas por OTA.



**Figura 2:** Avaliação do efeito em aves, do tratamento com OTA, através dos valores médios de monócitos, segundo teste de Tukey (DMS =0,604657). CON - grupo controle; PBS - Aves tratadas via intraperitoneal com 40mg/kg de PBS e OTA - Aves tratadas via intraperitoneal com 40mg/kg de OTA diluída em solução salina tamponada (PBS).



**Figura 3:** Avaliação estatística (teste de Tukey, DMS=1,32836) das valores de monócitos obtidos do 1º ao 21º dia pós tratamento de aves com 40mg/kg de OTA. CON - grupo controle; PBS - Aves tratadas via intraperitoneal com 40mg/kg de PBS e OTA - Aves tratadas via intraperitoneal com 40mg/kg de OTA diluída em solução salina tamponada (PBS). (1d) no primeiro dia, três horas após tratamento (AT); (2d) aos sete dias AT; (3d) aos 14 dias AT e (4d) aos 21 dias AT.

A biodisponibilidade integral de 40 µg por kg de peso vivo, empregado no presente experimento, possibilitou a ação efetiva da toxina sobre os leucócitos circulantes. De outro modo, a assimilação precoce desta micotoxina, mesmo que extemporânea, pode afetar enormemente o potencial e a saúde das aves de corte. A geração de radicais livres e a inibição de enzimas citoplasmáticas causariam uma depleção no número de monócitos e afetariam, em longo prazo, a ativação da resposta específica das aves que, por sua vez, responderiam de maneira indesejável às imunizações e seriam mais susceptíveis a hemorragias e infecções.

## Conclusões

A ocratoxina A, na dose única de 40mg/kg diluída em solução salina tamponada, administrada por via intraperitoneal em frangos de corte no primeiro dia de vida, promoveu uma redução estatisticamente significativa dos valores percentuais de células do sistema fagocítico-mononuclear e linfócitos circulantes, em relação aos valores dos grupos controle e PBS.

## Agradecimentos

O presente trabalho teve o apoio do CNPq e da CAPES.

## Referências

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CABANES, F.J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *J. food. Prot.* v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.
- ALMOSNY, N.R.P.; SILVA, K.P.; MELO, D.L.S.; VASCONCELOS, T.C.; MONTEIRO, A.O. Hematologia de aves: valores normais em hemograma de mutum de alagoas (Mitu mitu mitu). *Rev. Bras. Cienc. Vet.* v. 5, p. 33-38, 1998.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clin. Microbial Rev.* v. 3, n. 16, p. 497-516, Review, 2003.
- BLAXHALL, D. L.; DAIISLEY, K. W. Rotine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, v. 5, p. 771-781, 1973.
- BOX, G. E. P. Problems in the Analysis of Growth and Weer Curves. *Biometrika.* v.6. p. 362-389, 1950.
- CHANG, C. F.; HAMILTON, P. B. Impairment of phagocytosis in chicken monocystis during aflatoxicosis. *Poult. Sci.* v. 58, p. 562-566, 1980.
- CORRIER, D. E. Mycotoxicosis: Mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 30, p. 73-87, 1991.
- CRUZ, L. C. H. Micotoxinas: são importantes? Perspectiva latino-americana. Rio de Janeiro: UFRRJ Editora, 1996. 261 p.
- DWIVED, P. BURNS, R.B. Pathology of ochratoxicosis A young broilers chicks, *Research in Veterinary Science*, v. 36 p. 92-103, 1986.
- FELDMAN, B. F.; ZILKEL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*, 5. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 597-739.
- GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; PANAGULA, V. S.; HOEFF, F. J. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. *Poult. Sci.* v. 64, p. 1678-1684, 1985.
- GOMES, F. P. *Curso de Estatística Experimental*. 13. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 1990. 468 p.
- HAWKEY, C. M.; DENNETT, T. B. *Atlas of comparative veterinary haematology*. London: Wolf Publishing. 1989, 365 p.
- HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poult. Science*, v. 67, n. 8, p. 1139-1146, 1988.

A redução dos fagócitos sanguíneos em aves de produção provocada por OTA provoca uma deficiência da resposta imune inata e consequentemente uma má elaboração da resposta humoral duradoura, tornando o plantel mais susceptível a infecções primárias e oportunistas, o que acarretaria uma diminuição na conversão alimentar e um atraso do período de abate.

JELINEK, C. F.; POHLAND, A. E.; WOOD, G. E. Worldwilde occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update. *J. Agric. Food. Chem.* v. 72, p. 223-230, 1989.

KRÜGER, C. D. *Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária. I Determinação dos níveis séricos por cromatografia líquida. II Correlação com as lesões renais e hepáticas*. 2006. Monografia (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2006.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assemente of ochratoxin A: an update. *Food additives and Contaminants*, v.13, suplement, 1996.

McNULTY M. S. Chickens anemia agent: a review. *Avian. Pathol.* v. 20, p. 215-223, 1991.

MOURA, M. A.; MACHADO, C. H.; PORFÍRIO, L. C.; PEREIRA, E. B. B.; FREIRE, R. B. Effects of ochratoxin a in the leucocytes of broilers. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v. 6, n. 6, p. 187-190, 2005.

PEREIRA, A. V. *Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (Manihot esculent Grantz.)*, 1989. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. 1989.

PITT, J. I.; BASÍLICO, M. L.; ABARCA, M. L.; LOPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi, *Medical Mycology*, v. 38, suplement L, p. 41-46, 2000a.

PITT, T. L. Toxigenic fungi: Whith are importante?. *Medical Mycology*, v. 38, suplement L, p. 17-22, 2000b.

PORFIRIO, L. C. *Hematologia, bioquímica e imunologia de aves experimentalmente intoxicadas com 0,04 mg/kg de Ochratoxina-A*. 2002. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Sanidade animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 2002.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Mycotoxin of *Fusarium* ssp. Commercial Poultry. *Cienc. Rural*, v. 31, n. 1, p. 185-190, 2001.

SMITH, H.; GANADESIKAN, R.; HUGHES, J. B. Multivariate analysis of Variance (MANOVA). *Biometrics*. Raleigh, v. 18, n. 1, p. 22-41. 1962.

STANDER, M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; STEYN, P. S. Screening of comercial hidrolases for degradation of Ochratoxin A. *J. Agric. Food. Chem.* v. 48, p. 5736-5739, 2000.

STUDER-KOHR I.; DIETRICH D.R.; SCHLATTER J.; SCHLATTER C. The Occurrence of Ochratoxin A in Coffee. *Food Chem. Toxicol.* v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.

VELLEMAN, P. F.; WILKINSON, L. Nominal, ordinal, Interval, and Ratio typologies Are Misleading. "The American Statistician", v. 47, n. 1, p. 65-72, 1993.