

# PERFIL LEUCOCITÁRIO DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM OCHRATOXINA A<sup>1</sup>

Marcos de Assis MOURA<sup>2</sup>  
Carlos Henrique MACHADO<sup>3</sup>  
Lenir Cardoso PORFÍRIO<sup>4</sup>  
Elizabeth Bernardo Ballesteiro PEREIRA<sup>5</sup>  
Ronald Bastos FREIRE<sup>6</sup>

**RESUMO:** Alterações leucocitárias provocadas pela administração de doses baixas de ocratoxina-A (OTA) foram avaliadas em 120 pintos de um dia da marca comercial Hiyeld/Resende frangos de corte. Os animais foram separados em três grupos experimentais: grupo 1 (n=40) sem tratamento; grupo 2 (n=40) tratado com ocratoxina-A e grupo 3 (n=40) tratado com solução salina tamponada. Amostras de sangue obtidas no dia da aplicação, e aos sete, 14 e 21 dias de vida foram analisadas. Houve uma redução de leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) nas aves tratadas, sugerindo toxidez aguda decorrente da exposição à baixa dose da micotoxina em aves neonatas após uma única exposição.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Hematologia, Leucócitos, Ocratoxina-A

## LEUCOCYTES OF BROILERS TREATED WITH OCHRATOXIN A

**ABSTRACT:** Leucocytes dysfunction caused by the administration of a low dose of ochratoxin A (OTA) was evaluated in 120 one day old chicks from the Brazilian commercial cross-breed HIYIELD/REZENDE. The experiment was carried out in three groups of animals: group 1 (n=40) constituted of non treated animals; group 2 (n=40) with animals treated with OTA and group 3 (n= 40), which received a phosphate buffered saline (PBS). A significant reduction of mononuclear leucocytes in all treated chicks, was observed suggesting an acute toxicity as a result of the exposure to a low dose of OTA in neonatal chicks.

**INDEX TERMS:** Hematology, Avian Leucocytes, Ochratoxin-A.

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 07.04.06

<sup>2</sup> Médico Veterinário, M.Sc., Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Endereço: Avenida Embaixador Abelardo Bueno, 3000 (1/306), Cep.22775-040, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro (RJ) (021) 9873-1677. E-mail: m.a.moura@ig.com.br

<sup>3</sup> Médico Veterinário, PhD., Instituto de Veterinária/UFRRJ.

<sup>4</sup> Médica Veterinária, PhD., Instituto de Veterinária/UFES.

<sup>5</sup> Médica Veterinária, PhD., Instituto de Matemática/UFRRJ.

<sup>6</sup> Farmacêutico, PhD., Instituto de Biologia/UFRRJ

## 1 - INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos fúngicos, heterogêneos na sua natureza química e com ações farmacológicas variadas, que podem causar danos a animais, resultando na diminuição e da performance 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, POHLAND; WOOD, 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 à ocorrência de hemorragias subcutâneas e imunossupressão (GIAMBRONE et al., 1985).

A ocratoxina-A (OTA) é um pentapeptídeo derivado da isocumarina e da L-fenilalanina, produzido sob a forma de metabólito secundário, por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (PITT, J. I, 2000; PITT, T L., 2000). Sua denominação foi definida por ter sido isolada pela primeira vez, como produto xenobiótico, de cultivares de *Aspergillus ochraceus* (STUDER-KOHR et al., 1995). O efeito nefrotóxico da OTA foi demonstrado, embora existam evidências de

que as diferentes espécies animais possuam sensibilidades variáveis (STUDER-KOHR et al., 1995). À OTA também são atribuídos efeitos teratogênico, imunossupressor, carcinogênico (KUIPER-GOODMAN, 1996) e hepatotóxico (STANDER et al., 2000).

Em aves, a OTA, causa supressão da hematopoiese, efeito imunossupressor sobre o timo, bursa de fabricius, baço e linfonodos (CRUZ, 1996; CHANG; HAMILTON, 1980; CORRIER, 1991).

Um estudo, recentemente realizado (MOURA et al, 2005) com frangos de corte de um dia (Hiyeld/Resende) demonstrou que uma única exposição à OTA, na dose de 0,04mg/kg, por via intraperitoneal, promoveu significativa redução no número total de leucócitos, três e seis horas 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 bazófilos circulantes (PORFÍRIO, 2002)

No presente trabalho, tem-se como objetivo avaliar os efeitos hematológicos da administração de uma única dose de 0,04mg/kg de OTA em frangos de corte da marca comercial Hiyeld/Resende, durante os primeiros 21 dias de vida.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 120 pintos de um dia, da marca comercial Hiyeld/Resende,

fornecidos pela Granja Resende/Minas Gerais, separados em três grupos experimentais: grupo 1 -controle; grupo 2-tratados via intraperitoneal com 40µg/kg de OTA diluída em solução salina tamponada (PBS), não houve óbitos das aves tratadas, uma vez que a dose utilizada foi bastante segura, estando bem abaixo da DL50 pra frangos de corte, (PORFÍRIO, 2002) e grupo 3-tratados via intraperitoneal com 40µg/kg de PBS; com 40 animais em cada grupo.

As aves foram alimentadas com ração comercial para frangos de corte, negativa para OTA, 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 10 animais de cada grupo nos quatro dias de amostragem: 1ª amostragem (1d) no primeiro dia, três horas após tratamento (AT); 2ª amostragem (2d) aos sete dias AT; 3ª amostragem (3d) aos 14 dias AT e 4ª amostragem (4d) aos 21 dias AT. Após amostragem, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical (HUFF; KUBENA; HARVEY, 1998).

A mensuração da leucometria global (LCG) foi realizadas por contagem manual, em câmara de Neubauer, utilizando a diluição de 1/100 e a observação microscópica em aumento de 400x (ALMOSNY, 1998).

Como diluente, foi utilizada solução de Dacie modificada, conforme recomendação 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, Zilkl e Jain (2000)

Aos resultados, foram aplicadas transformações de dados (Tabela 1) segundo indicações da literatura (Box, 1950; SMITH; GANADESIKAN; HUGHES, 1962; GOMES, 1990; VELLEMAN; 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; WILKINSON, 1993). Os resultados transformados (Tabela 2) 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 (DMS) (PEREIRA, 1989; GOMES, 1990; VELLEMAN; WILKINSON, 1993).

Todos os resultados foram obtidos e analisados através do programa para computador StatSoft™.

Tabela 1 - Transformação aplicada aos dados segundo indicações da literatura após estudo preliminar a respeito das pressuposições para a Análise da Variância

Variáveis	Transformação
LCG	Log(v10)
Basófilos	Raiz 4(v12+1)
Eosinófilos	SQRT(V14)
Heterófilos	Raiz 4(v16+1)
Linfócitos	Log(v18)
Monócitos	Raiz 4(v20+1)

Tabela 2 - Distribuição dos valores médios após transformação de dados segundo os tratamentos e os dias de coleta (amostragem).

Célula	Tratamento	Dia de coleta (amostragem)				Médias
		1º dia (1d)	7º dias (2d)	14º dias (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

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem global de leucócitos (leucocitometria), neutrófilos, eosinófilos e basófilos não foram influenciados pelo tratamento ( $P > 0,05$ ). De outro modo, observaram-se efeitos prolongados do tratamento sobre os percentuais de linfócitos e monócitos circulantes  $p < 0,01$ , (Figuras 1 e 2). Tais efeitos podem ser atribuídos a uma imunossupressão específica, com diminuição da proliferação de linfócitos, em razão da aplicação de OTA (ABARCA et al., 2001; BENNETT, KLICH, 2003), corroborando com a literatura, na qual se afirma que ocorrem, em intoxicações crônicas, depleção do tecido linfóide no timo, baço e bursa de Fabrício, com diminuição da atividade de linfócitos B (CHANG; HAMILTON, 1980; CORRIER, 1991).

Ao se realizarem avaliações do número de monócitos circulantes nos diferentes dias após intoxicação (DAI) a OTA, observou-se uma redução numérica significativa ( $p < 0,05$ ) que se prolongou nos 2, 3 e 4 DAI (Figura 3). Esses resultados diferem dos dados anteriormente obtidos e sugerem que a monocitose, registrada para as primeiras horas que se seguiram à exposição (PORFÍRIO, 2002), seria atribuída uma necrose tecidual provocada pelo procedimento de administração da OTA, pela via intraperitoneal, e não pela ação estimulatória da micotoxina (MOURA et al, 2005). Embora atribua pouca importância à monocitopenia em aves, pois estas, normalmente, estão presentes em pequenas proporções na circulação (McNULTY, 1991), os resultados obtidos, 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. Possivelmente, a micotoxina tenha promovido estresse metabólico em tais células que, uma vez afetadas em seus mecanismos de síntese protéica e de extrusão de quimiocinas, seriam prejudicadas em suas atividades de ativação e regulação da proliferação de linfócitos. Esses dados hematológicos sugerem que a exposição prematura a uma única dose de OTA afeta as células inflamatórias, regulando negativamente os processos de morte celular natural. Tal possibilidade, embora careça de estudos mais aprofundados, não parece ser específica e explica a necrose associada a diferentes células e tecidos devido às intoxicações crônicas por OTA (STUDER-KOHR et al., 1995; KUIPER-GOODMAN, 1996; STANDER et al., 2000). A biodisponibilidade integral de 40  $\mu\text{g}$  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, com inibição de caspases, 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, tal como descrito na literatura (GIAMBRONE et al., 1985). Assim, a linfopenia observada estaria relacionada a alterações nos hormônios (quimiocinas) que afetam o tráfego leucocitário, e não a um efeito específico da OTA sobre populações linfocitárias.

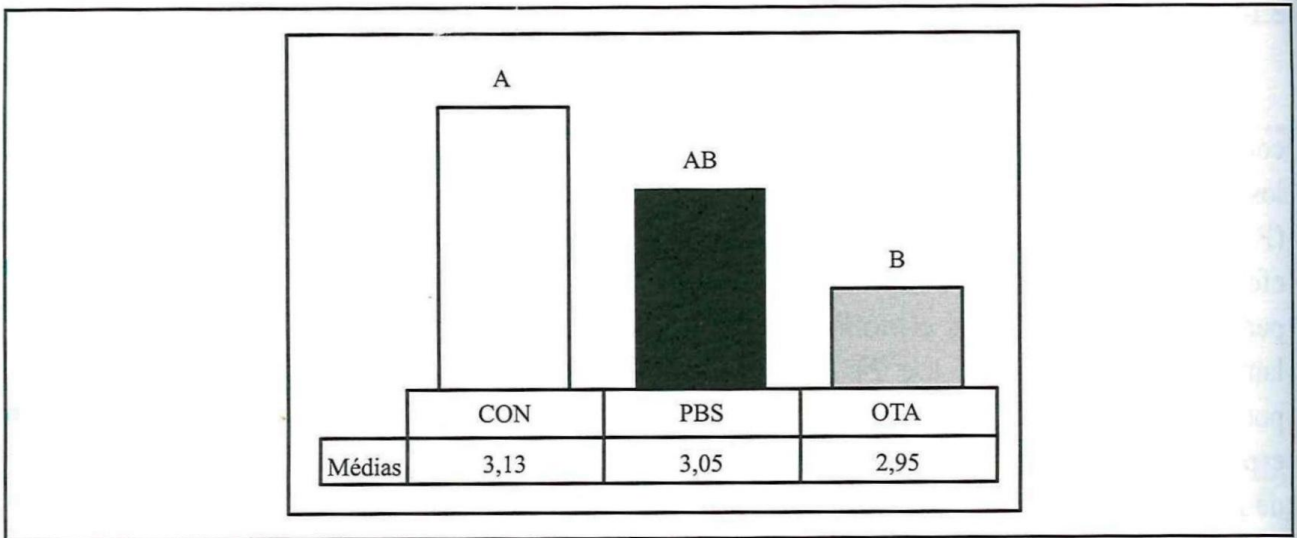


Figura 1 - Médias da contagem de linfócitos segundo o tratamento (teste de Tukey, DMS =0,11031).

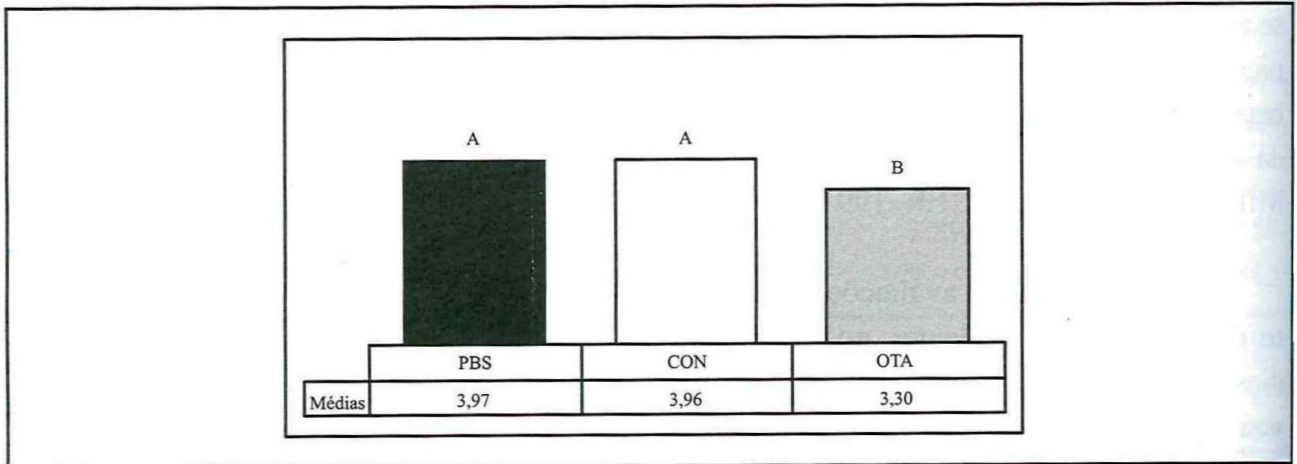


Figura 2 - Distribuição das médias de tratamentos dos valores de monócitos (teste de Tukey, DMS = 0,604657)

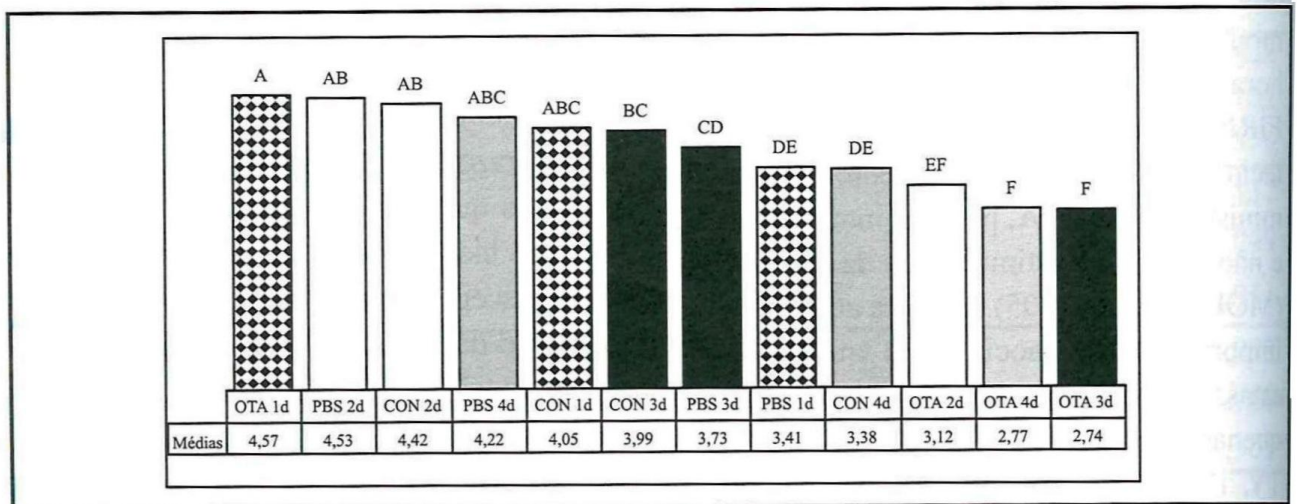


Figura 3 - Médias da contagem de monócitos em razão da interação tratamento versus dias (teste de Tukey, DMS=1,32836).

#### 4 CONCLUSÃO

A ocratoxina A na dose única de 40µg/kg diluída em solução salina tampoadada, 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 foi apoiado pelo CNPq e pela 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.903-6, 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.*, v. 3, n.16, p.497-516, 2003.
- BLAXHALL, D. L.; DAISLEY, K. W. Routine 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 wear curves. *Biometrika*, v.6, p.362-389, 1950.
- CHANG, C. F.; HAMILTON, P. B. Impairment of phagocytosis in chicken monocystitis 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. 261p.
- FELDMAN, B. F.; ZILKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5 th 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: Nobel, 1990. 468 p.
- HAWKEY, C. M.; DENNETT, T. B. *Atlas of comparative veterinary haematology*. London: Wolf Pub., 1989. 365p.
- HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poult. Science*, v.67, n.8, p. 1139-46, 1988.
- JELINEK, C. F.; POHLAND, A. E.; WOOD, G. E.. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update. *J. Agric. Food Chem.*, v.72, p. 223-230, 1989

- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants*, v.13, 1996. Supplement.
- 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 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, p.41-46, 2000. Supplement L.
- PITT, T. L. Toxigenic fungi: Which are importante? *Medical Mycology*, v.38, p.17-22, 2000. Supplement L.
- PORFIRIO, L. C. *Hematologia, bioquímica e imunologia de aves experimentalmente intoxicadas com 0,04 mg/kg de Ochratoxina-A*. 2002. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.
- SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Mycotoxin of *Fusarium* spp. 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.