

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABELECIMENTO DE ESCORES HISTOPATOLÓGICOS DE LESÃO
HEPÁTICA E DETERMINAÇÃO DOS VALORES NORMAIS DAS ENZIMAS
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E CREATINA QUINASE EM
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação de Mestrado

Lucas Brunelli de Moraes

Porto Alegre

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTABELECIMENTO DE ESCORES HISTOPATOLÓGICOS DE LESÃO
HEPÁTICA E DETERMINAÇÃO DOS VALORES NORMAIS DAS ENZIMAS
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E CREATINA QUINASE EM
FRANGOS DE CORTE**

AUTOR: Lucas Brunelli de Moraes
Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na Área de
Sanidade Avícola do Programa de Pós-
graduação em Ciências Veterinárias da
UFRGS

Orientador: Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Porto Alegre

2004

Aos meus pais pelo exemplo de caráter, dignidade, e por todo amor que sempre me deram.

Aos meus queridos Tiago, Juliana e Volnei pelo companheirismo, amizade e amor que demonstram de forma gratuita e incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Carlos Tadeu Pippi Salle e ao Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes pela confiança depositada e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu ex-orientador Ari Bernardes da Silva - *in memoriam* - pelo exemplo de bravura e força.

Aos amigos, Jairo Ramos de Jesus, Guilherme Osório Scheneider, Guilherme Fonsceca de Souza, Denise Marques Garcia, Rosecler Alves Pereira, Laurício Librelotto Rubin, Mariângela Algayer e José Luis Maria pelo carinho e ajuda incondicionais.

A Vera Beatriz Wald pelo auxílio estatístico realizado neste trabalho.

Aos demais colegas mestrandos, doutorandos, estagiários e funcionários do CDPA e da UFRGS pelo apoio.

Assuma postura humilde, singela e digna, pois só assim poderás formar o alicerce para que tomes atitudes fortes, retas e coerentes.

Lucas Brunelli de Moraes

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Micotoxicoses.....	14
2.1.1 Aflatoxicose.....	15
2.1.1.1 Mecanismo de Ação.....	15
2.1.1.2 Formas de Apresentação da Doença.....	16
2.1.1.2.1 Forma Aguda.....	16
2.1.1.2.2 Forma Crônica.....	17
2.1.1.3 Perdas Econômicas.....	17
2.1.1.4 Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA).....	18
2.2 Enzimologia.....	19
2.2.1 Enzima Creatina Quinase.....	21
2.2.2 Enzima Aspartato Aminotransferase.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Granjas.....	24
3.2 Lotes de Frangos de Corte.....	24
3.3 Coleta das Aves.....	24
3.4 Pesagem das Aves.....	25
3.5 Coleta de Sangue das Aves e Teste Bioquímico.....	25
3.6 Necropsia das Aves.....	25
3.7 Coleta dos Fígados.....	25
3.8 Dosagem de Aflatoxina Hepática.....	26
3.9 Processamento Histopatológico.....	26
3.10 Análise dos Cortes Histológicos.....	26
3.11 Análise dos Resultados.....	27
3.12 Obtenção dos Padrões Enzimáticos.....	27

4 RESULTADOS	29
4.1 Escores Histopatológicos	29
4.2 Valores de Referência	30
4.3 Freqüência Absoluta do Número de Aves para as Categorias de AST e CK dos Frangos	31
4.4 Histopatologia Relacionada com o Teste de ELISA	31
4.5 Escores Histopatológicos Relacionados com os Níveis de AST	33
4.6 Escores Histopatológicos Relacionados com o Peso das Aves	34
4.7 Níveis de Aflatoxina Relacionados com o Peso das Aves	36
4.8 Níveis de Aflatoxina em Relação aos Níveis Enzimáticos	36
4.9 Níveis de AST Comparados com o Peso das Aves	36
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
Anexo A - Escores histopatológicos de lesão hepática ..	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Escores de lesão histopatológica referentes ao percentual de lesão hepática.....	28
TABELA 2 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de necrose dos hepatócitos	30
TABELA 3 – Número e percentual de aves, distribuídos por escore histopatológico de vacuolização dos hepatócitos	30
TABELA 4 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de hiperplasia dos ductos biliares	31
TABELA 5 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de infiltração periportal de células inflamatórias.....	31
TABELA 6 - Valores normais das enzimas aspartato aminotransferase e creatina quinase obtidos pelo método colorimétrico (U/L), em frangos de corte aos 28 dias de idade	31
TABELA 7 – Distribuição do número de aves em função dos níveis enzimáticos detectados	32
TABELA 8 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionados com os escores de necrose dos hepatócitos.....	33
TABELA 9 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionados com os escores de vacuolização dos hepatócitos	33
TABELA 10 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionados com os escores de hiperplasia dos ductos biliares.....	34
TABELA 11 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionado com o escore de infiltração periportal de células inflamatórias	34
TABELA 12 – Níveis de AST relacionados com os escores de necrose dos hepatócitos	35
TABELA 13 – Níveis de AST relacionados com o escore de vacuolização dos hepatócitos	35
TABELA 14 – Escores de necrose dos hepatócitos relacionados com o peso corporal das aves(g)	36

TABELA 15 – Escores de vacuolização dos hepatócitos relacionados com o peso corporal das aves(g).....	36
TABELA 16 – Escores de hiperplasia dos ductos biliares relacionados com o peso corporal das aves(g).....	37
TABELA 17– Escores de infiltração periportal de células inflamatórias relacionados com o peso corporal das aves(g).....	37

RESUMO

A aflatoxicose é uma doença causada pela ingestão de aflatoxinas, as quais constituem um grupo de metabólitos altamente tóxicos e carcinogênicos, produzidos principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O mecanismo de ação das micotoxinas na célula animal ocorre na maioria das vezes, através de alterações dos processos metabólicos básicos e de alterações da função mitocondrial, da síntese protéica e de ácidos nucléicos, sendo este último um dos principais sítios de ação das aflatoxinas. A aflatoxicose pode se apresentar de duas formas. A forma aguda se caracteriza por desordem hepática, hemorragias e alta mortalidade; e a crônica, pela queda na produção, penas arrepiadas, paralisia imunossupressão e diarreia. Foram estudados 18 lotes de frangos de corte com 28 dias de idade, provenientes de seis produtores de nível bom produtivo, seis de nível médio e seis produtores de baixo nível de produção; totalizando 180 aves. As aves foram pesadas e sacrificadas, sendo coletadas amostras de fígados e de soros. Os fígados foram fixados em formalina a 10%, para análise histopatológica e congelados a -20°C para teste de ELISA. Das amostras de soro foram realizados testes de dosagem enzimática de aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK) na tentativa de confirmar a lesão hepática. Os cortes histológicos de fígado foram analisados e escores de lesão estabelecidos para necrose e vacuolização dos hepatócitos, hiperplasia dos ductos biliares e infiltração periportal de células inflamatórias. Os escores de cada lesão foram comparados com os níveis de aflatoxina obtidos pelo teste de ELISA, com o peso das aves e com os valores de AST e CK. Além disso, foram comparados os níveis de aflatoxina com o peso dos frangos e com os valores enzimáticos. Por fim, estes valores de AST e CK foram relacionados com o peso dos frangos. Foi possível concluir que, nas condições estudadas, os escores de lesões hepáticas são inversamente proporcionais aos níveis de aflatoxina detectados nos fígados de frangos com 28 dias de idade. Observou-se também, que não há relação entre os valores de AST, em função dos níveis de lesão hepática e dos valores de aflatoxina detectados; e a dosagem de AST não se presta como teste preliminar para detecção de lesão hepática causada pela ingestão de aflatoxina em frangos de corte aos 28 dias de idade.

ABSTRACT

Aflatoxicosis is a disease that is caused by the ingestion of aflatoxines, which constitute a group of highly toxic and carcinogenic metabolites mainly produced by the fungus *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The action mechanism of the micotoxins in the animal cell happens, in the majority of the times, through alterations in the basic metabolic processes and in the mitochondrial function, of the protein and nucleic acids synthesis. The nucleic acids synthesis is one of the main sites of the aflatoxines action. Aflatoxicosis may present in two distinct ways: the acute form is characterized by hepatic disorder, bleeding and high mortality; and the chronic form is characterized by production decrease, shivered feathers, palsy, immunosuppression and diarrhea. It was studied 18 portions of 28 days old chickens from six producers of good level, six of medium level and six producers of low-level production; adding 180 birds up. The birds were weighed and sacrificed and it was collected samples of liver and blood. The livers underwent fixation in formaline 10%, for histopathological analysis and were frozen at -20°C for ELISA test. From the serum samples it was made aspartate aminotransferase (AST) enzymatic dosage and creatine kinase (CK) enzymatic dosage in order to attempt hepatic lesion confirmation. The histological sections were analyzed and it were settled lesion scores for necrosis and vacuolization of the hepatocytes, hyperplasia of the biliary ducts and periportal infiltration by inflammatory cells. The scores for the lesions were compared to the aflatoxin levels obtained through ELISA test, to the birds weight and to the AST and CK values. Besides, it were compared the aflatoxin levels, the chicken weight and the enzymatic values. Finally, these AST and CK values were related to the chickens weight. It was possible to conclude that, under the studied conditions, the ratio of hepatics lesions scores are reversed to the aflatoxin levels detected in the 28 days old chickens livers. It was observed that there is no relation between the AST values related to the hepatic lesion levels and to the detected aflatoxin values; and the AST dosage doesn't fit as a preliminary test for detecting hepatic lesion caused by the aflatoxin ingestion in 28 days old chicken.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é um dos setores da indústria agropecuária que mais se desenvolveu nos últimos anos no Brasil. A Associação Gaúcha de Avicultura – ASGAV forneceu alguns dados estatísticos que ilustram bem esta afirmação. No estado do RS existem 16 frigoríficos com Inspeção Federal e 05 com Inspeção Estadual; existem 09 incubatórios independentes, 40 produtores de ovos associados e 120 mini e pequenos produtores de ovos independentes. O complexo avícola gaúcho é responsável por gerar 45 mil empregos diretos e 800 mil indiretos, tendo cerca de 8.500 famílias de produtores de frango de corte integrados. No ano de 2002, o estado do Rio Grande do Sul alojou 607,6 milhões de pintos de corte e abateu cerca de 602 milhões de aves, produzindo 1.000.000. de toneladas de carne e comercializando 912,3 mil toneladas. Tudo isso gerou um faturamento estimado em R\$ 1,231 bilhão, tendo-se exportado 450,2 mil toneladas (Us\$385,8 milhões) e destinado ao mercado interno 462,4 mil toneladas. A produção de ovos (vermelhos e brancos) foi de 3.500.000 caixas com 30dz. Este quadro fez com que o Brasil se tornasse, em 2003, o segundo produtor (7.517 mil toneladas) e exportador mundial (1.600 mil toneladas).

Números como estes servem de incentivo e estímulo para trabalhar e pesquisar no setor avícola, assim ajudando a avicultura a crescer e tecnificar-se.

Para auxiliar neste processo de desenvolvimento é que se decidiu realizar este trabalho, o qual foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Unidade Central em Porto Alegre-RS. O CDPA é um órgão da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), tendo iniciado suas atividades no ano de 1992. O CDPA ainda possui um laboratório regional no município de Garibaldi-RS, que foi fundado no mês de agosto do ano de 1995 e atende os criadores da região da serra.

O CDPA possui um laboratório de histopatologia que trabalha com diversos materiais, oriundos de projetos de pesquisa e de amostras de campo.

Atualmente é muito comum o envio de fígados para diagnóstico histopatológico. No ano de 2003 o CDPA/UFRGS deu entrada em 714 protocolos para análise, dos quais 294 (41,17%) foram encaminhados ao setor de histopatologia. Do total de protocolos remetidos a este setor, 82 (27,89%) receberam um diagnóstico compatível com as

alterações causadas por micotoxinas. Esse diagnóstico sugestivo é dado através de uma avaliação subjetiva das alterações encontradas no fígado. Avalia-se o grau de necrose hepática, grau de vacuolização dos hepatócitos, a intensidade de hiperplasia dos ductos biliares e o grau de infiltração periportal granulócitos. Os resultados são fornecidos aos veterinários de campo de forma descritiva, onde somente se relata os achados histopatológicos e sugere-se a ação de micotoxinas. Em geral, busca-se a presença de micotoxinas no alimento e nas vísceras das aves para confirmação do diagnóstico.

Ao receber o resultado, o veterinário tem idéia das alterações encontradas, mas permanece sem saber qual a gravidade dessas alterações. Por este motivo sente-se falta de uma de quantificação do grau das lesões, para que o produtor tenha idéia da gravidade da injúria do órgão. Mesmo não tendo conhecimento aprofundado sobre o assunto, o solicitante do exame saberá que um fígado com escore 1 tem um grau de lesão menor que outro com escore 3.

Esta quantificação não traz benefícios apenas ao produtor, mas também ao laboratorista, pois este lança mão de um instrumento metodologicamente mais eficaz de observação e de diagnóstico histopatológicos.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer os escores de lesão histopatológica de fígado, determinar os valores padrão para as enzimas AST e CK e comparar, tanto os escores quanto os valores enzimáticos e o peso das aves, com os níveis de aflatoxina determinados pelo teste de ELISA do fígado destas aves.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micotoxicoses

Micotoxicose é o nome dado às doenças causadas pela ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (micotoxinas), que afeta tanto os animais quanto o homem. Existem mais de cem tipos de micotoxinas, sendo a toxicidade, a frequência de ocorrência e os órgãos alvos consideravelmente variados (HOERR, 1991).

A natureza tóxica das micotoxinas para aves foi primeiramente observada em 1960 na Inglaterra, quando ocorreu a morte de mais de cem mil perus. A enfermidade, então, desconhecida foi inicialmente denominada de "DOENÇA X" dos perus (BLOUNT, 1961). Depois verificou-se que o agente causal era uma aflatoxina presente na farinha de amendoim que fazia parte da ração das aves (ALCROFT et al., 1961).

Enormes prejuízos econômicos são decorrentes da utilização de alimentos contaminados por estas substâncias tóxicas. Quando não provocam a morte da ave em processos de intoxicação aguda, as micotoxinas determinam diminuição de peso, diminuição da postura, aumento da conversão alimentar, aumento da suscetibilidade às doenças infecciosas e parasitárias, além de problemas reprodutivos entre outros. Segundo Hoerr (1996), várias micotoxinas possuem o poder de causar lesão no trato gastrointestinal, mais especificamente no intestino. Essas lesões variam desde atrofia de vilosidades até enterite hemorrágica.

As principais condições que favorecem o desenvolvimento de fungos no armazenamento tanto de grãos quanto de alimentos são: temperatura (ótima 25-30° C), umidade dos grãos (maior que 13,0%), pH, taxa de oxigenação, período de armazenamento, grau de contaminação, condições físicas dos grãos ou semente (LILLEHOJ, 1973). De acordo com Wood (1992), a presença de micotoxinas é inevitável, sendo impossível impedir totalmente a sua ocorrência durante a colheita e a armazenagem dos grãos.

Dentre as micotoxinas de maior importância, destacam-se as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) e as ocratoxinas (A, B e C), por serem as mais tóxicas e por serem produzidas em grão e alimentos.

2.1.1 Aflatoxicose

A aflatoxicose é uma doença causada pela ingestão de aflatoxinas, as quais constituem um grupo de metabólitos altamente tóxicos e carcinogênicos, produzidos principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O grupo das aflatoxinas compreende as toxinas B₁, B₂, G₁, e G₂, das quais a B₁ é a predominante e também a mais tóxica (HOERR, 1991).

As aflatoxinas recebem a designação B ou G devido à propriedade de emitirem coloração azul (blue=B) ou verde-azulada (green=G) sob luz ultravioleta. Do ponto de vista químico, são cumarinas termorresistentes, insolúveis em óleo, pouco solúveis em água e bastante solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares como clorofórmio, metanol, etanol e dimetil sulfóxido. A aflatoxina é instável à ação de luz ultravioleta, agentes oxidantes ou a condições extremas de pH (<3 e >10), mas é degradada facilmente através da reação com amônia ou hipoclorito de sódio (IARC, 1993).

2.1.1.1 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação das micotoxinas na célula animal ocorre, na maioria das vezes, através de alterações dos processos metabólicos básicos (como no metabolismo de carboidratos, lipídios e esteróides) e de alterações da função mitocondrial, da síntese protéica e de ácidos nucléicos, constituindo-se estes últimos nos principais sítios de ação das aflatoxinas. Todos esses efeitos primários, somados à ação direta sobre enzimas, proteínas ou coenzimas, determinam efeitos secundários que alteram a regulação da atividade metabólica da célula afetada (KIESSLING, 1986). Clifford e Rees (1966) demonstraram que após uma hora da ingestão da aflatoxina, já há inibição da síntese protéica devido a uma marcante inibição da síntese de RNA-polimerase. Esses autores sugerem a seguinte seqüência de eventos no curso das aflatoxicoses: a toxina entra no núcleo da célula hepática, une-se ao DNA e deste modo inibe a síntese de RNA-polimerase e reduz a síntese de RNA-mensageiro. A inibição do RNA-mensageiro reflete-se, 15 minutos após, na diminuição da síntese protéica.

Swick (1984) observou que a aflatoxina é transformada em um composto mais polar através da oxidação, redução, hidrólise ou conjugação. Desta forma, a aflatoxina é

mais facilmente excretada pela bile e pela urina. Ao mesmo tempo, a oxidação transforma a aflatoxina num composto mais reativo, que facilmente forma ligações covalentes irreversíveis com os ácidos nucleicos e com as proteínas celulares funcionais.

2.1.1.2 Formas de Apresentação da Doença

Cruz (1995) refere-se às alterações provocadas pelas aflatoxinas de acordo com o sistema orgânico afetado. No sistema gastrointestinal, podem ser observadas alterações como diarreia e hemorragia intestinal, atrofia de vilosidades, necrose e fibrose. No sistema cutâneo observa-se icterícia, conseqüente à desordem hepática. No sistema imune é observada redução da atividade imunológica, seja pela diminuição da atividade do complemento e da quantidade de imunoglobulinas, e pelo decréscimo da atividade fagocitária e linfocitária, além do efeito imunossupressor sobre o timo, bolsa de Fabrício e baço. No sistema cardiovascular, a aflatoxicose leva à fragilidade vascular com conseqüente ocorrência de hemorragias nos mais diversos órgãos. No sistema reprodutor, podem ser observadas alterações como embriotoxicidade e teratogenia. No sistema endócrino, as alterações ocorrem nas glândulas adrenais, observando-se aumento de volume e necrose.

Patterson (1983) afirma que a aflatoxina induz a formação de tumores hepáticos em todas as espécies animais, porém aquelas com período de vida produtiva curto, como é o caso do frango de corte na avicultura industrial, não há tempo suficiente para o desenvolvimento de tais alterações.

A exposição à aflatoxina pode ser aguda ou crônica, dependendo da dose e do período de exposição à toxina (LAZZARI, 1993).

2.1.1.2.1 Forma Aguda

A aflatoxicose aguda é caracterizada por desordem hepática, sendo manifestada pelos sinais clínicos de prostração, anorexia, icterícia e, dependendo da dose ingerida, alta mortalidade (LEESON et al., 1995). Microscopicamente, Hoerr (1996) descreve a aflatoxicose hepática aguda como sendo responsável pela degeneração gordurosa,

necrose, aumento do núcleo dos hepatócitos com marginalização da cromatina e nucléolo proeminente; observando-se também rápida proliferação dos ductos biliares.

2.1.1.2.2 Forma Crônica

A aflatoxicose crônica não é facilmente reconhecida, pois prejudica a produtividade do lote (LEESON *et al.*, 1986). Sinais clínicos como depressão, perda de apetite, olhos fechados, penas arrepiadas, paralisia e diarreia foram observadas em frangos de corte por Arshad *et al.* (1993). A aflatoxicose crônica caracteriza-se microscopicamente pela degeneração dos hepatócitos com a presença de figuras de mitose, a qual pode estar circundada por ductos biliares proliferados e tecido fibroso (HOERR, 1996).

Doerr *et al.* (1983) verificaram que as maiores perdas econômicas ocorrem quando frangos são expostos à intoxicação crônica por aflatoxina. Demonstraram, ainda, que é difícil estabelecer um nível “seguro” de contaminação do alimento para que não ocorram efeitos adversos no desempenho das aves, já que a toxicidade da aflatoxina varia com fatores estressantes presentes no meio ambiente.

2.1.1.3 Perdas Econômicas

Jones *et al.* (1982), ao estudarem a relação entre o índice de eficiência dos produtores de frangos de corte e a contaminação por aflatoxina das rações consumidas, concluiu que os melhores produtores apresentavam concentrações menores de aflatoxina nas rações e em uma frequência menor do que os piores produtores. As amostras do milho utilizado na produção das rações possuíam índices mais baixos de toxina em comparação aos níveis encontrados nas rações armazenadas na granja. Relacionando esses dados com valores de temperatura e umidade relativa do ar, o autor sugere a possibilidade de aparecimento de aflatoxinas entre a produção e estocagem da ração e que baixos níveis dessa toxina estão associados com diminuição da produtividade em aves aparentemente saudáveis.

Aumentando-se gradualmente a dose de aflatoxina (0,625; 1,250; 2,50; 5,00 e 10,00 ppm) incorporada ao alimento das aves, verificou-se um aumento no tamanho do fígado, baço e do pâncreas, ao passo que houve uma diminuição no peso da bursa de

Fabrcio (SMITH; HAMILTON, 1970) e do timo (THAXTON et al.,1974). A dose limiar para o aumento do figado foi menor do que aquela utilizada para os outros rgãos testados, isso indicando que o figado é o rgão mais suscetível à aflatoxina. A maior dose produz um retardo significativo no ganho de peso; contudo, quando o alimento contaminado é removido as aves afetadas retomam seu ganho de peso normal (SMITH; HAMILTON, 1970).

2.1.1.4 Ensaio Imuno–Enzimático (ELISA)

O emprego do ELISA para detecção de aflatoxinas em alimentos tem sido estudado nos últimos anos. Peska (1988) e Fukal (1990), destacaram as seguintes vantagens para a detecção de aflatoxina B₁, quando comparados aos demais testes convencionais: facilidade de execução, especificidade, sensibilidade e economia. Contudo, a pesquisa de aflatoxina na ração enfrenta algumas limitações, como o alto custo e a pouca representatividade de algumas amostras, já que a toxina não se distribui de forma homogênea nos silos, o que permite o encontro de amostras falso negativas. Além disso, muitas amostras de ração são coletadas diretamente das fábricas onde as condições de armazenagem são extremamente controladas. As coletas devem ser feitas nas propriedades, pois existem situações em que o produtor recebe uma ração livre, ou com baixos níveis de aflatoxina e as péssimas condições de estocagem fazem com que ocorra a multiplicação do *A. flavus* e a produção de aflatoxina.

Salle *et al.* (1994) demonstraram, utilizando o ELISA após extração simples por metanol, que era possível detectar aflatoxina B₁ em fígados de frangos de corte com 42 dias de idade e com peso médio de 1.800g. As aves foram inoculadas com 200 ppb de aflatoxina B₁, em dose única, diretamente no inglvio. Aos 30 minutos, 1, 2, 5, 8, 12 e 24 horas pós-inoculação (p.i.), foram sacrificados 5 animais tratados e 4 controles, coletando-se 40g de fígado de cada ave. Houve diferença significativa na quantidade de aflatoxina presente em todos os animais tratados e seus respectivos controles. O diferencial entre tratados e controles aos 30 minutos pi foi de 33,7 ppb. Com 1 e 2 horas pi a diferença foi de 33,7 ppb e 18,66 ppb, respectivamente. Por estes resultados, os autores acreditam que este método possa ser útil para o diagnóstico da aflatoxicose, já que evidencia a ingestão da aflatoxina pela ave. Todavia, a aflatoxina pura só é detectável no fígado, pelo teste de ELISA, até duas horas após a ingestão do alimento

contaminado. Este fato dificulta o diagnóstico, pois não se tem o controle do período de ingestão do alimento pela ave, fato que leva à um aumento dos resultados “falsos negativos”. Outra limitação da detecção deste teste ocorre na interpretação dos resultados, pois se tem somente o nível de aflatoxina encontrado no fígado, mas não se consegue saber o reflexo disso na estrutura e função hepática.

2.2 Enzimologia

Cada célula de um órgão possui uma função específica e contém enzimas destinadas a auxiliar nesta função. Em muitas situações as enzimas são específicas de um único órgão, em outros casos estas enzimas são encontradas em inúmeros órgãos. Quando a integridade da célula é comprometida, as enzimas vazam para circulação, onde sua atividade pode ser medida obtendo-se o índice de lesão celular (HOCHLEITHNER, 1994).

Segundo o mesmo autor, para ter importância diagnóstica, deve ocorrer a realização de testes ordenados, sendo que a viabilidade econômica do teste e a capacidade de fornecer indícios de alterações patológicas em um órgão específico ou de um pequeno grupo de órgãos também devem ser considerados. A enzima deve também ser estável na amostra, por tempo suficiente para a permitir sua detecção.

É importante ter em mente que a célula deve ser lesada para que ocorra o vazamento excessivo de suas enzimas para a circulação. Entretanto, os testes de base-enzimática são uma medida de lesão, e não necessariamente uma medida de função do órgão. Por exemplo, a anóxia causa perda da integridade da membrana celular, tanto que as enzimas solúveis no citosol podem vazar para o plasma. No caso de doença hepática, é comum observar um quadro histológico normal e valores bioquímicos significativamente aumentados, sendo que esta perda da integridade pode ser observada histologicamente como um aumento no volume celular (HOCHLEITHNER, 1994).

Segundo Krammer e Hoffmann (1997), o aumento de uma enzima em particular também depende de fatores como o seu padrão de produção, padrão de liberação e de permanência no plasma. Enzimas citoplasmáticas são liberadas mais rapidamente durante a degeneração celular, ao passo que enzimas mitocondriais serão liberadas mais tardiamente, somente após severa lesão do órgão.

Segundo os autores, enzimas com elevadas concentrações nos órgãos, mas com uma meia-vida curta, são de valor clínico limitado, pois possuem um rápido desaparecimento do plasma. Entende-se por meia-vida de uma enzima, o tempo necessário para que se reduza pela metade a concentração da mesma no plasma. Amostras de sangue com EDTA não são ideais para dosagem enzimática, pois o EDTA age como quelante de alguns íons metálicos que servem para máxima atividade das enzimas. O plasma e as células devem ser separados imediatamente, para que se evite o extravasamento de enzimas intracelulares para o plasma. Igualmente, se os elementos são separados do plasma e este congelado, descongelado e armazenado sob refrigeração por muitos dias, pode ocorrer uma queda significativa nos níveis enzimáticos.

A atividade enzimática nos tecidos ou soro geralmente é baixa, sendo que esta não é diretamente ligada à quantidade presente no tecido. Por esta razão, as enzimas são medidas indiretamente, baseando-se na sua atividade *in vitro* sob condições específicas e controladas, sendo sua atividade diretamente proporcional à concentração enzimática. Existe uma infinidade de métodos usados por diferentes laboratórios para detectar a atividade enzimática. Com isso, o intervalo de referência varia entre laboratórios, apesar de todos resultados serem expressos em U/L. O valor dos testes varia de acordo com o substrato, *buffer* e temperatura de incubação utilizados nos laboratórios (HOCHLEITHNER, 1994).

Segundo Lumeij (1994), para facilitar a interpretação do quadro é aconselhável incluir na bioquímica plasmática indicadores sensíveis e específicos de lesão hepática e muscular. Eles devem ser influenciados pela elevação da atividade das enzimas plasmáticas, como sinal de lesão celular recente e não necessariamente como sinal de comprometimento da função do órgão. Muitas enzimas não são específicas de um único órgão, além disso, em condições crônicas, tendo ocorrido lesões muito extensas no passado, pode ter induzido uma maior disfunção do órgão enquanto as enzimas podem estar dentro de padrões normais. Isso é comum em aves com fibrose hepática onde encontra-se níveis normais de aspartato aminotransferase (AST). Quando testes periódicos de bioquímica sérica são realizados em aves com doença hepática, flutuações das enzimas e dos sais biliares são freqüentemente observados. Ocasionalmente ambas variáveis podem ser encontradas dentro dos intervalos de referência.

2.2.1 Enzima Creatina Quinase

Segundo Lumeij (1997), as isoenzimas creatina quinase (CK) catalisam a fosforilação reversível da creatina para formar creatina fosfato. A creatina quinase tem função nos músculos cardíaco e esquelético e no cérebro, sendo que no músculo esquelético ela produz ATP para contração muscular através da fosforilação do ADP (HOCHLEITHNER, 1994).

As isoenzimas CK são dímeros de dois protômeros com massas individuais de 40Kda. Os três primeiros são denominados de CK₁, CK₂ e CK₃. O cérebro possui o homogêneo CK₁ (CK-BB) composto de dois protômeros B. Os músculos cardíaco e esquelético contêm o homogêneo CK₃ (CK-MM), sendo composto por dois protômeros M. A CK₂ é uma isoenzima híbrida (CK-MB) e a quarta variante, CK-Mt, está localizada entre as membranas mitocondriais, representando cerca de 15% do total de CK do músculo cardíaco (LUMEIJ, 1997). Ainda segundo o autor, inúmeros fatores e condições inibem as CKs, sendo todas ativadas pelo Mg²⁺ e inibidas pelo seu excesso. Devido a rápida oxidação dos grupos sulfidrilas no sítio de ação, elas são instáveis quando estocadas sob refrigeração, temperatura ambiente ou congelamento. Segundo Kerr (2003), a CK é uma enzima pequena, com meia vida curta e mesmo nos casos de aumentos exorbitantes por rabdomiólise (em eqüinos), ela volta ao normal em 24 a 48hs.

Numerosos métodos são viáveis para a quantificação da CK do soro. Os mais comuns são eletroforese, cromatografia e imunológica. Os métodos imunológicos requerem anticorpos monoclonais espécie-específicos anti-CK. A reação cruzada entre a CK-humana e a animal não é relatada. Em medicina humana, o método imunológico é o mais utilizado, contudo, devido a especificidade dos anticorpos, em veterinária utiliza-se para rotina os outros métodos citados acima (LUMEIJ, 1997).

A CK pode ser um indicador bastante sensível de lesão muscular, tendo muitos propósitos clínicos. Esta enzima tem valor na distinção entre a lesão muscular e a hepática. Contudo, os clínicos devem considerar que lesões musculares e hepáticas podem ocorrer concomitantemente por um mesmo processo patológico, ou por distintos (HOCHLEITHNER, 1994). Muitas células contêm CK, contudo o músculo esquelético possui alta atividade desta enzima, sendo que somente grandes aumentos nos níveis de CK possuem significado clínico, pois pequenas lesões musculares e injeções

intramusculares são capazes de produzir aumentos detectáveis da atividade da enzima no soro. Moderadas isquemias musculares transitórias, convulsões e tremores também resultam em aumento da CK sangüínea (LUMEIJ, 1997).

Devido à sua curta meia-vida, sua atividade volta rapidamente ao normal após a demanda muscular. Este problema pode ser superado complementando-se a CK-músculo específica com uma enzima menos específica, mas de meia-vida mais longa, que é a AST. Um pequeno aumento de CK e um marcado aumento de AST, serve como indicador de provável isquemia muscular dias antes da coleta das amostras de sangue.

Deficiências nutricionais de vitamina E e selênio (Se) resultam em instabilidade das membranas musculares e liberação da CK no soro. Na ausência de alterações induzidas pelo exercício em animais (ovelha e cabra) clinicamente normais, com elevados níveis de CK no soro, pode-se sugerir a deficiência de Vitamina E e/ou Se como agente causador deste aumento. Hochleithner (1994) afirma que variações dos níveis de CK são bem descritas em aves, sendo que em perus a CK é bastante sensível à estresse físico e exercícios.

2.2.2 Enzima Aspartato Aminotransferase (AST)

A AST faz parte de um grupo de enzimas que catalisam a interconversão dos aminoácidos e oxiácidos por transferência do grupo amino (HOCHLEITHNER, 1994).

Segundo Krammer e Hoffmann (1997), a AST (*aspartate aminotransferase*) ou GOT (*Glutamic oxalacetic transaminase*), catalisa a transformação da L-aspartato e 2-oxoglutarato em oxalacetato e glutamato.

Duas isoenzimas da AST estão presentes no hepatócito, uma na mitocôndria e outra no citoplasma (TENNANT, 1997), sendo que as duas enzimas têm massa de 92Kda e múltiplas formas translacionais (KRAMMER e HOFFMANN, 1997).

Ainda segundo os autores, a presença da AST em muitos tecidos faz desta enzima um marcador não específico, mas altamente sensível indicador de leve lesão tecidual. Apesar da CK ser um melhor indicador de lesão muscular, a AST é freqüentemente utilizada como complemento diagnóstico. Lumeij (1994) completa a informação, dizendo que a AST é o mais sensível indicador de lesão hepática em pombos, não sendo sua atividade específica de lesão hepática, pois elevações podem ser vistas em casos de lesão muscular.

Lumeij (1997) diz que a distribuição da AST varia entre os órgãos e espécies animais. Altas atividades de AST têm sido descritas no fígado, músculo esquelético e cardíaco, cérebro, rins (HOCHLEITHNER, 1994), pâncreas e eritrócitos (TENNANT, 1997). Lumeij (1997) afirma que geralmente o aumento nas concentrações enzimáticas é uma medida de lesão tecidual recente e diminuição da função do órgão. A atividade basal da enzima no plasma é geralmente um reflexo do acúmulo e da mudança sofrida pelo tecido que contém esta enzima. Por exemplo, a atividade da CK no plasma aumenta em proporção direta ao aumento da massa muscular esquelética como resultado do treinamento. O aumento da atividade da CK pode ser visto como resultado da excitação pelo excesso de manejo dos animais. Entretanto, na doença hepática crônica, com fibrose e redução do número de hepatócitos funcionais, os níveis enzimáticos para função hepática podem estar dentro dos parâmetros normais, apesar da severa lesão do órgão. Os valores da AST são idade-dependentes e variam entre as diferentes espécies. A causa desta dependência ainda não foi estabelecida e diferenças de gêneros não foi descrita. Em geral, atividade de AST de pássaros acima de 230 U/I é considerada anormal. Atividades anormais têm sido ligadas à deficiência de vitamina E, Selênio, metionina, doenças hepáticas, intoxicações por pesticidas e tetracloreto de carbono e lesões musculares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Granjas

Foram estudados 18 lotes de frangos de corte, sendo seis pertencentes a produtores considerados de nível baixo produtivo, seis de nível médio e seis de bom nível de produção, de acordo com os índices de produção alcançados nos lotes anteriores. Todos os lotes pertenceram à uma mesma integração, sendo os seis escolhidos aleatoriamente em sorteio dentro de cada categoria requerida (nível bom, médio e ruim) de uma lista de 10 integrados de cada categoria.

3.2 Lotes de Frangos de Corte

Todos os lotes pertenciam a uma mesma linhagem, possuíam o mesmo esquema vacinal e provinham de um mesmo incubatório. As aves foram vacinadas no primeiro dia de vida para a doença de Marek, vírus da bronquite infecciosa e boubá aviária. Aos 7, 14, e 21 dias as aves foram vacinadas para doença de Gumboro com vacina de cepa intermediária.

A ração das aves era proveniente de uma mesma fábrica e as especificações quanto ao nível protéico e de nutrientes eram as mesmas para todos os lotes. As aves receberam até os 21 dias de vida ração tipo inicial e, até a data da coleta, a ração tipo crescimento. Como os lotes de frango de corte foram fornecidos por uma empresa avícola, a ração recebeu adsorvente (aluminossilicato de Na e Ca) em todos os lotes analisados, na dose de 4,5kg por tonelada de ração. Esta prática é rotineira na empresa, sendo impossível, para as condições do projeto, trabalhar com rações livres de adsorventes.

3.3 Coleta das Aves

As aves foram coletadas aos 28 dias de idade, utilizando-se o período da manhã para realização das coletas. Visando a aleatoriedade, por essa razão dividiu-se o galpão em duas partes distintas para realização das coletas. Dez aves em cada lote foram

capturadas (cinco machos e cinco fêmeas). Elas foram acondicionadas em caixas específicas para o transporte de frangos e transportadas até o laboratório após cada coleta.

3.4 Pesagem das Aves

As aves foram identificadas individualmente e pesadas com o auxílio de um dinamômetro. Os valores obtidos foram transferidos para uma planilha que continha o número respectivo da ave.

3.5 Coleta do Sangue e Teste Bioquímico

Foram coletados 3mL de sangue das aves através da punção cardíaca. O soro foi acondicionado em microplacas e congelado à -20°C. Com os soros das aves foram realizadas análises bioquímicas das atividades das enzimas AST e CK. Estas análises foram feitas através do método colorimétrico, pela utilização de "Kits" comerciais: "kit" AST/TGO LIQUIFORM-LABTEST, para a verificação dos níveis da enzima AST e CK-NAC® da LIQUIFORM-LABTEST, para verificação dos valores da enzima CK.

Este método foi adotado, pois segundo Farver (1989) é o método mais seguro e preciso para a determinação dos níveis enzimáticos.

3.6 Necropsia das Aves

As aves foram sacrificadas por eletrochoque (220v) e necropsiadas no CDPA/Garibaldi.

3.7 Coleta dos Fígados

Os fígados foram coletados, sendo parte do órgão congelada à -20°C e o lobo hepático esquerdo fixado em formalina tamponada a 10% para a realização dos cortes histológicos.

3.8 Dosagem de Aflatoxina Hepática

Os fígados congelados foram utilizados para pesquisa de aflatoxina B₁, através da técnica de ELISA quantitativa, sendo estes testes realizados através de “kits” comerciais RIDASCREEN®FAST AFLATOXIN, da R-BIOPHARM; os quais consistem de tiras de microplacas impregnadas com anticorpos monoclonais contra aflatoxina.

3.9 Processamento Histológico dos Fígados

Os fígados fixados em formalina tamponada a 10% foram cortados, acondicionados em cápsulas e processados conforme as técnicas histológicas descritas por Luna (1968), sendo estes cortes corados com hematoxilina e eosina.

3.10 Análise dos Cortes Histológicos

Os cortes histológicos dos fígados foram observados ao microscópio óptico quanto à estimativa do grau de necrose dos hepatócitos (nec) e grau de vacuolização dos hepatócitos (vac), sendo o corte histológico observado em toda sua extensão e o percentual de lesão atribuído conforme a distribuição desta lesões na lâmina. Não focou-se a quantificação do grau de lesão em uma área específica, evitando-se superestimar a lesão em possíveis casos de necrose e/ou vacuolização focais ou multifocais. O grau de hiperplasia de ductos biliares (hdb) também foi avaliado observando-se toda a superfície do corte e todos os ductos biliares nele presentes. Quantificou-se a hiperplasia de ductos biliares conforme a formação de pregas no epitélio tubular, o número e o volume destas pregas além da redução do lúmen tubular. Por fim, quantificou-se o grau de infiltração periportal de células inflamatórias (ipci), contabilizando-se apenas a infiltração de granulócitos e não considerando a presença de figuras de mitose nestes sítios de infiltração. A estimativa do grau de lesão hepática foi avaliada subjetivamente, atribuindo valores em porcentagem para cada um dos itens (nec, vac, hdb e ipci); onde 0 representa a ausência de lesão e 100% o grau máximo de lesão detectável.

Categorizou-se os percentuais de lesão para cada uma das lesões hepáticas em uma escala de 1 a 4 conforme a tabela abaixo.

Tabela 1 – Escores de lesão histopatológica referentes ao percentual de lesão hepática

Escores	% de lesão
1	0-9
2	10-30
3	31-60
4	61-100

Foram realizadas 2 observações das lâminas para diminuição do risco de erro da leitura histológica.

3.11 Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *Statistical Software*, versão 13.2, Minitab® Inc.

3.12 Obtenção dos Padrões Enzimáticos

Devido a dificuldade de se obter na literatura os níveis séricos normais para a enzima AST e devido à falta de valores normais para a enzima CK em frangos de corte; tomou-se a iniciativa de realizar um ensaio para determinação dos padrões normais.

O ensaio constituiu na criação de 90 aves de uma mesma linhagem pesada comercial, fornecidas por uma empresa avícola. Estas foram criadas do 1º ao 28º dia em baterias de isolamento, sendo alojadas em gaiolas de metal recebendo água e ração *ad libidum*.

A ração fornecida as aves era livre de aflatoxinas, condição avaliada através da pesquisa da toxina por ELISA; isso para descartar a possibilidade de um aumento da AST em consequência de lesão hepática causada pela micotoxina. Estas também foram privadas de qualquer desgaste físico, fatores estressantes e excesso de manejo antes e durante a coleta do material, sendo tomados diversos cuidados para evitar o estresse ou a fadiga muscular das aves; fatores que acarretariam um aumento das enzimas AST e CK.

Aos 28 dias de idade foram coletados 3 mL de sangue através de punção cardíaca, utilizando-se seringas descartáveis agulhadas de 5 mL. Após a obtenção dos soros através do processo de coagulação, os mesmos foram acondicionados em

microplacas e congelados a -20°C . Todas as aves foram numeradas e seus soros acondicionados e processados individualmente.

Os soros foram submetidos a análise pelo método colorimétrico, através utilização de "Kits" comerciais: "kit" AST/TGO LIQUIFORM-LABTEST, para a verificação dos níveis da enzima AST e CK-NAC® da LIQUIFORM-LABTEST, para verificação dos valores da enzima CK.

4 RESULTADOS

4.1 Escores Histopatológicos

A tabela abaixo apresenta o número de aves e seu respectivo percentual em função dos escores de necrose dos hepatócitos.

Tabela 2 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de necrose dos hepatócitos.

Escores	Nº de aves	%
1	12 ^a	6,94
2	82 ^b	47,40
3	59 ^b	34,10
4	20 ^a	11,56
	173	100

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,05).

Pelo teste de Qui-quadrado as categorias 1 e 4 têm significativamente menos aves em relação as categorias 2 e 3. Não havendo diferença entre 1 e 4, e 2 e 3.

A Tabela 3 mostra o número e o percentual de aves distribuídos para cada categoria de vacuolização dos hepatócitos.

Tabela 3 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de vacuolização dos hepatócitos.

Escore	Nº de aves	%
1	38 ^a	21,97
2	66 ^b	38,15
3	34 ^a	19,65
4	35 ^a	20,23
	173	100

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,05).

O número de aves da categoria 2 foi superior as demais categorias, não havendo diferença entre estas (1, 3 e 4).

A distribuição do número e do percentual de aves em função dos escores de hiperplasia dos ductos biliares está representado na tabela abaixo.

Tabela 4 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de hiperplasia dos ductos biliares.

Escore	Nº de aves	%
1	92 ^a	53,18
2	57 ^b	32,95
3	13 ^c	7,51
4	11 ^c	6,36
	173	100

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,05).

A categoria 1 possui maior número de aves que a categoria 2, sendo que esta possui um número maior de aves que 3 e 4. Não havendo diferença significativa entre as duas últimas.

A tabela seguinte mostra a distribuição das aves em relação aos escores de infiltração periportal de células inflamatórias.

Tabela 5 – Número e percentual de aves distribuídos por escore histopatológico de infiltração periportal de células inflamatórias.

Escore	Nº de aves	%
1	107 ^a	61,85
2	40 ^b	23,12
3	20 ^b	11,56
4	6 ^c	3,47
	173	100

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,05).

A categoria 1 possui um número maior de aves e o escore 4 possui o número menor, não havendo diferença entre os escores 2 e 3.

4.2 Valores de Referência

Citam-se abaixo, os resultados obtidos, como os valores da amplitude enzimática normal para frangos de corte aos 28 dias de idade.

Tabela 6 - Valores normais das enzimas aspartato aminotransferase e creatina quinase obtidos pelo método colorimétrico (U/L), em frangos de corte aos 28 dias de idade.

Enzimas	Mínimo	Máximo
AST	175,24	209,0
CK	879,3	1260,7

(p=0,05)

4.3 Frequência Absoluta do Número de Aves para as Categorias de AST e CK dos Frangos.

A tabela abaixo mostra a distribuição dos frangos para cada categoria (acima, normal e abaixo) de AST e CK, em função dos valores padrão estabelecidos na Tabela 6.

Tabela 7 – Distribuição do número de aves em função dos níveis enzimáticos detectados

Categorias	AST	CK
Abaixo	65 ^a (44,83)*	12 ^a (9,12)*
Normal	27 ^b (18,62)*	19 ^a (14,29)*
Acima	53 ^a (36,55)*	102 ^b (76,69)*

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,013).

* Percentual correspondente

Os dados foram analisados através do teste de Qui-Quadrado, onde se obteve os resultados que seguem: para AST, o número de aves que se encontra dentro da faixa de normalidade (27) é significativamente menor ao observado nas categorias acima e abaixo, não havendo diferença entre estas últimas. No entanto para CK, o número de aves com valores acima da faixa de normalidade (102) foi significativamente maior quando comparado com as categorias abaixo e normal, não havendo diferença significativa entre as últimas.

4.4 Histopatologia Relacionada com Teste de ELISA

A tabela abaixo representa os níveis de aflatoxina (ppb) em função dos escores de necrose dos hepatócitos.

Tabela 8 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionados com os escores de necrose dos hepatócitos.

Escores necrose dos hepatócitos	ELISA Médio	ELISA Desvio Padrão	Nº de aves
1	2,83 ^a	5,87	12
2	1,16 ^b	3,70	78
3	1,11 ^b	5,10	58
4	0,11 ^c	0,20	20

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,05).

Os dados foram analisados fazendo-se o teste de Turkey, o qual demonstrou que os níveis de aflatoxina do escore 1 são significativamente maiores que os encontrados no escore 4, não existindo diferença entre os níveis de aflatoxina dos escores 2 e 3. Os níveis de aflatoxina diminuem conforme aumenta o índice de necrose dos hepatócitos.

Os níveis de aflatoxina obtidos pelo teste de ELISA (ppb) em relação ao grau de vacuolização dos hepatócitos está expresso na Tabela 9.

Tabela 9 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionados com os escores de vacuolização dos hepatócitos (vac).

Escores vac	ELISA Médio	ELISA Desvio Padrão	Nº de aves
1	1,58 ^a	4,29	38
2	1,31 ^b	4,96	62
3	1,22 ^b	4,71	34
4	0,25 ^c	0,80	34

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,016).

A análise estatística das variáveis, através do teste de Kruskal-Wallis, apontou que os níveis de aflatoxina do escore 1 de lesão são maiores que os valores encontrados no escore 4, não existindo diferença entre os níveis de aflatoxina dos escores 2 e 3. Assim como o observado nos escores de necrose, os níveis de aflatoxina diminuem conforme aumenta o índice de vacuolização dos hepatócitos.

Com relação aos escores histopatológicos de hiperplasia dos ductos biliares relacionados com os níveis de aflatoxina detectados, obtiveram-se os seguintes resultados, conforme a Tabela 10.

Tabela 10 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionados com os escores de hiperplasia dos ductos biliares (hdb).

Escores hdb	ELISA Médio	ELISA Desvio Padrão	Nº de aves
1	1,29 ^a	4,06	89
2	1,19 ^a	5,19	56
3	0,38 ^a	1,10	13
4	0,47 ^a	1,12	10

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,637).

A análise de variância mostrou que não existe diferença entre os valores de aflatoxina e as categorias histopatológicas de hiperplasia dos ductos biliares. Os valores

de aflatoxina tendem a diminuir com o aumento dos escores de lesão, salvo no escore 4, o qual apresenta um valor levemente superior (0,47ppb) ao escore 3 (0,38ppb).

Na Tabela 11 estão descritos os níveis de aflatoxina correlacionados com os escore de infiltração periportal de células inflamatórias

Tabela 11 – Níveis de aflatoxina (ppb) obtidos por teste de ELISA relacionado com o escore de infiltração periportal de células inflamatórias.

Escores Ipci	ELISA Médio	ELISA Desvio Padrão	Nº de aves
1	0,75 ^a	1,93	105
2	1,06 ^a	4,47	38
3	3,63 ^a	9,72	19
4	0,61 ^a	1,46	6

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,228).

A análise estatística das variáveis demonstrou não haver diferença significativa entre os valores detectados pelo teste de ELISA e as categorias de histopatológicas de lesão. No entanto, observa-se que o escore 3 é o que possui o maior nível médio de aflatoxina (3,36ppb) e o escore 4, o mais baixo (0,61ppb).

4.5 Escores Histopatológicos Relacionados com os Níveis de AST

Os valores de AST foram relacionados apenas com os escores de necrose e de vacuolização dos hepatócitos, uma vez que estas células possuem a AST e irão liberá-la na circulação da ave, caso ocorra lesão.

A Tabela 12 mostra o nível médio da enzima AST conforme o grau de necrose dos hepatócitos.

Tabela 12 – Níveis de AST relacionados com os escores de necrose dos hepatócitos

Escores Necrose	AST Médio	AST Desvio Padrão	Nº de aves
1	180,82 ^a	45,27	8
2	186,10 ^a	64,30	64
3	206,03 ^a	63,63	49
4	166,65 ^a	57,67	19

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,099).

Ao examinar os dados expressos na tabela acima, não foi detectada diferença significativa nos níveis da enzima AST para as categorias histopatológicas de necrose

dos hepatócitos. Os valores de AST para os escores 1, 2 e 4 estão dentro da faixa de normalidade, sendo que apenas o valor referente ao escore 3 (166,65) que se encontra abaixo desta faixa.

A tabela abaixo apresenta os valores de AST conforme as categorias de vacuolização dos hepatócitos.

Tabela 13– Níveis de AST relacionados com o escore de vacuolização dos hepatócitos

Escores Vacuolização	AST Médio	AST Desvio Padrão	Nº de aves
1	174,84 ^a	55,62	29
2	175,65 ^a	59,88	48
3	223,28 ^a	65,71	29
4	195,35 ^a	60,68	34

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,005).

A análise de variância dos dados correlacionados acima mostra que não existe diferença entre os níveis de AST para os diferentes escores de vacuolização dos hepatócitos. Os valores enzimáticos, com exceção do escore 3 (223,28), estão dentro da faixa de normalidade.

Foi realizada a ANOVA entre os níveis de CK e as lesões histopatológicas, a qual demonstrou não haver relação entre estas variáveis, para todas as categorias de lesão.

4.6 Escores Histopatológicos Relacionados com o Peso das Aves

A tabela abaixo mostra os pesos das aves para as quatro categorias de necrose dos hepatócitos.

Tabela 14– Escores de necrose dos hepatócitos relacionados com o peso corporal das aves(g)

Escores Necrose	Peso Médio	Desvio Padrão	Nº de aves
1	1148,3 ^a	136,6	12
2	1107,4 ^a	153,0	82
3	1137,7 ^a	153,1	59
4	1146,2 ^a	225,8	20

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,588).

Não existe diferença entre o peso das aves para os escores de necrose dos hepatócitos.

A Tabela 15 representa o peso em função das categorias de vacuolização dos hepatócitos..

Tabela 15– Escores de vacuolização dos hepatócitos relacionados com o peso corporal das aves(g)

Escores Vacuolização	Peso Médio	Desvio Padrão	Nº de aves
1	1127,9 ^a	151,2	38
2	1114,0 ^a	172,5	66
3	1115,4 ^a	131,4	34
4	1152,1 ^a	179,4	35

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,703).

Não foi observada relação entre o peso das aves e o nível de vacuolização dos hepatócitos.

Na Tabela 16 estão relacionados os valores do peso das aves em função do grau de hiperplasia dos ductos biliares.

Tabela 16– Escores de hiperplasia dos ductos biliares relacionados com o peso corporal das aves(g)

Escores hdb	Peso Médio	Desvio Padrão	Nº de aves
1	1135,9 ^a	161,3	92
2	1093,4 ^a	163,5	57
3	1219,6 ^a	142,3	13
4	1086,4 ^a	131,5	11

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,051).

Também não foi observada diferença significativa entre as categorias de hiperplasia dos ductos biliares e o peso das aves.

Aa tabela abaixo representa os valores dos pesos das aves em função dos diferentes graus de infiltração periportal de células inflamatórias.

Tabela 17– Escores de infiltração periportal de células inflamatórias relacionados com o peso corporal das aves(g)

Escores ipci	Peso Médio	Desvio Padrão	Nº de aves
1	1114,3 ^a	168,2	107
2	1152,6 ^a	157,1	40
3	1098,7 ^a	123,7	20
4	1220,8 ^a	154,4	6

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p=0,233).

Não há relação entre os pesos das aves em função dos escores de infiltração periportal de células inflamatórias.

4.7 Níveis de Aflatoxina Relacionados com o Peso das Aves

A análise de variância demonstrou não haver relação estatisticamente significativa entre os níveis de aflatoxina, detectados pelo teste de ELISA, e o peso corporal das aves (p=0,522).

4.8 Níveis de Aflatoxina em Relação os Níveis Enzimáticos

Não se observou associação entre os níveis de aflatoxina e os níveis das enzimas AST (p=0,38) e CK (p=0,875).

4.9 Níveis de AST Comparados com o Peso Corporal das Aves

A ANOVA não demonstrou relação alguma entre os níveis enzimáticos e o peso das aves (p=0,397).

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivos principais o estabelecimento dos escores histopatológicos de lesão hepática, a quantificação da aflatoxina nos fígados dos frangos de corte em estudo e a determinação da dosagem enzimática (AST e CK) destes animais, buscando-se a correlação entre estas variáveis.

É de conhecimento comum que as aflatoxinas são responsáveis por alterações no quadro histológico do fígado de diversas espécies animais e que existe uma relação direta entre a quantidade de aflatoxina ingerida e a intensidade de lesão detectada no fígado. Nas condições trabalhadas observou-se uma relação inversa entre o grau de lesão do órgão e os níveis de toxina detectados; isto é, que existe uma diminuição nos níveis de aflatoxina detectável nos fígados conforme aumentam os escores de lesão, salvo para hiperplasia dos ductos biliares, onde o menor valor de toxina corresponde ao escore 3 de lesão e para infiltração periportal de células inflamatórias, onde o escore 3 foi o que apresentou maior nível de aflatoxina detectada.

Como este trabalho representa um “corte transversal” das condições das granjas estudadas, não se espera que todas as aves tenham ingerido a mesma quantidade de toxina em um mesmo momento. Assim sendo, as aves que ingeriram uma quantidade maior de toxina ou por um período maior de tempo apresentaram maiores graus de necrose e vacuolização das células hepáticas. Por outro lado, estas aves com altos graus de lesão são aquelas que apresentaram menores níveis de aflatoxina detectada no fígado, o que significa que as mesmas deixaram de ingerir a toxina em um período anterior àquelas de escores histopatológicos menores. Esta hipótese pode ser fundamentada com os dados obtidos por Chen et al (1984), que intoxicaram frangos de uma semana de idade com aflatoxina nas doses de 1323ppb e 2057ppb. Os pesquisadores constataram que no dia zero, 3 horas após a retirada da ração com toxina, era possível detectá-la em todos os tecidos estudados (músculo da coxa, músculo peitoral, fígado e moela); entretanto, 4 dias após a retirada do alimento com a toxina já não era mais possível detectá-la nos tecidos estudados. Bintvihok et al (2002) intoxicaram aves de 40 dias de idade com 3ppm de aflatoxina. Estas aves foram alimentadas por um período de 7 dias, sendo abatidas e pesquisados os níveis de toxina no músculo, fígado e ovos. Estes pesquisadores afirmam que os níveis de aflatoxina no fígado são dez vezes mais altos

dos que os encontrados nos músculos, e que os níveis de aflatoxina decrescem após a retirada do alimento contaminado. Estes achados reforçam a hipótese de que, devido ao grau de agressão sofrido pelo fígado, as aves podem ter apresentado uma redução no apetite, com isso uma diminuição da ingestão de ração e metabolização da aflatoxina ingerida.

No presente trabalho não foi detectada diferença entre o peso das aves para os diferentes escores de cada lesão histopatológica e, também não foi observada relação entre o peso das aves e os níveis de aflatoxina. Resultados semelhantes foram obtidos por Mabee e Chipley (1973), com 9 frangos de seis semanas de idade, contidos em gaiolas de metabolismo e que receberam 0,1ppm de aflatoxina em doses diárias (inoculada diretamente no papo) por 14 dias; não se observou diminuição do peso corporal, ganho de peso, consumo de alimento e conversão alimentar. Os animais foram abatidos e não se observaram alterações macroscópicas nos fígados das aves. Howarth e Wyatt (1976) intoxicaram aves com 5 e 10 ppm de aflatoxina e não constataram diferença no peso das aves nas seis primeiras semanas do experimento, contudo na décima semana foi detectada uma redução de 11% no peso corporal das aves. Resultados semelhantes foram encontrados por Maurice *et al* (1983), os quais administraram 50 e 100ppb de aflatoxina em pintos de dois dias de idade por três semanas. Os pesquisadores não observaram diferença no peso corporal das aves em relação ao grupo controle.

Estes dados não põem por terra a hipótese sugerida neste trabalho, uma vez que as aves foram criadas em condições controladas, fato este que não reflete a realidade vista no campo, onde a toxicidade da aflatoxina é influenciada por múltiplos fatores. Nota-se também que nos experimentos citados anteriormente não foram realizados exames histopatológicos dos fígados das aves, sendo assim estas podem não ter sofrido lesão hepática grave com as doses administradas nos experimentos. Segundo os resultados obtidos por Rodrigues (1996), o qual intoxicou frangos com 200ppb de aflatoxina administrada diretamente no inglúvio, somente é possível detectar a aflatoxina pelo teste de Elisa até duas horas após a ingestão, sendo que a partir deste período os níveis detectados são extremamente baixos ou iguais a zero. Este fato indica que a toxina só pode ser detectada na ave à campo até duas horas após a ingestão do alimento contaminado, pois a partir deste período a aflatoxina já foi metabolizada e seus metabólitos não são detectados pelo teste de Elisa. Os achados obtidos por

Rodrigues (1996) sugerem que aquelas aves com altos graus de necrose e vacuolização dos hepatócitos e com menores níveis de toxina detectados, realmente tenham deixado de ingerir o alimento em um período anterior às demais.

Outro ponto a ser discutido é a relação entre os escores de necrose e vacuolização dos hepatócitos e os níveis de AST detectados nos soros das aves. Um dos objetivos deste trabalho era determinar os níveis das enzimas (AST) das aves, uma vez que lesado o fígado pela aflatoxina seria possível visualizar o aumento enzimático, comprovando a agressão ao órgão. Esperava-se que estes dados pudessem auxiliar em um estudo preliminar de lesão hepática, fato que reduziria enormemente os custos com exames laboratoriais. Este aumento nos níveis enzimáticos foi encontrado por Oguz et al (2002), onde os pesquisadores criaram pintos de um dia de idade da linhagem Ross e os intoxicaram com 50 e 100ppb de aflatoxina na ração por 42 dias. Foram coletadas amostras de sangue para determinação dos níveis enzimáticos, os quais estavam aumentados – para a AST - em ambos tratamentos, com um aumento maior no segundo. Outro trabalho que encontrou aumento nos níveis de AST em aves foi o realizado por Diaz et al (1999), que utilizaram duas linhagens de postura comercial com 33 semanas de idade, uma normal (40 aves) e outra com predisposição para o aparecimento da síndrome do fígado gorduroso e hemorrágico (40 aves). As aves foram abatidas e 3mL de sangue foram coletados e os soros analisados quanto aos níveis de AST. Pôde-se observar que aquelas aves com predisposição ao aparecimento da síndrome do fígado gorduroso e hemorrágico apresentaram níveis elevados de AST.

Contudo, no presente trabalho não se detectou aumento nos níveis de AST nos frangos estudados, mesmo tendo-se constatado altos graus de lesão histopatológica nos fígados das aves. Isso sugere que estes testes de dosagem de AST não se prestam à realização de provas diagnósticas na rotina laboratorial. Resultados semelhantes foram obtidos por Gawai et al (1992) onde frangos (1,2-1,5 kg de peso corporal) receberam 1,5ppm de aflatoxina via intraperitonal (dose única). Amostras de sangue foram coletadas das aves e a AST foi dosada do soro, não se observando aumento nos níveis desta enzima. Outro trabalho em que não se detectou aumento nos níveis de AST em frangos foi realizado por Ostrowski-Meissner (1984), que administrou 0, 50, 100, 200 e 400ppb de aflatoxina em frangos por 14 dias, não observando alterações significativas no soro destas aves. Resultados semelhantes foram encontrados por Borsa *et* (1997) os quais intoxicaram aves de 1 dia de idade com 5ppm de aflatoxina, 5ppm de

aflatoxina+0,5% de bentoína e somente 0,5% de bentoína, até os 48 dias de idade. Os pesquisadores não observaram diferença nos níveis de AST nos diferentes tratamentos.

Ao compararmos os níveis de aflatoxina e os de AST, não se encontrou associação entre as variáveis. Isso reforça a hipótese de incapacidade do teste de dosagem enzimática de medir a agressão sofrida pelo fígado e de que as aves ingeriram quantidades de toxina diferentes e em períodos distintos.

Foi realizada uma cautelosa pesquisa bibliográfica a procura dos valores séricos normais das enzimas AST e CK para frangos de corte. Como resultado observou-se a carência bibliográfica referente aos valores padrão destas enzimas para frangos, fato este que desencadeou o projeto para a determinação destes níveis séricos. Não havendo citações na literatura pesquisada sobre este níveis, os valores obtidos no projeto foram utilizados como padrão para as amostras coletadas á campo.

6 CONCLUSÕES

- 1 - Nas condições estudadas, os escores de lesão hepática são inversamente proporcionais aos níveis de aflatoxina detectados nos fígados de frangos com 28 dias de idade.
- 2 - No presente trabalho não se observou relação entre os valores de AST, os níveis de lesão hepática e os valores de aflatoxina obtidos pelo teste de Elisa.
- 3 - A dosagem de AST não se presta com teste preliminar para detecção de lesão hepática causada pela ingestão de aflatoxina em frangos de corte com 28 dias de idade.
- 4 - A faixa de normalidade para os valores das enzimas AST e CK para frangos de corte é de 175,24 a 209 e 879,3 a 1260,7, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCROFT, R. et al. A toxic factor in brazilian groundnut meal. **Vet. Rec.** v.73, p. 428-429, 1961.

BINTVIHOK, A. et al. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. **J. Vet. Med. Sci.** v. 64, n.11, p.1037-1039, 2002.

BLOUNT, W.P. Turkey "X" disease. **Turkey.** v.9, p.55-58, 1961.

BORSA, A. et al. Enzimas de função hepática na aflatoxicose aguda experimental em frangos de corte. 1997 [S.l.:s.n,]

CHEN, C. et al. Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed contaminated diet. **Fd. Chem. Toxic.**, v.22, n6, p.451-477, 1984.

CLIFORD, J.I.; REES, K. R. Aflatoxin in site of action in the rat liver cell. **Nature**, v.209, p.312-313, 1966.

CRUZ, L.C.H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses. Reflexos na Indústria avícola. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Anais.** Curitiba, 1995.p.1-13.

DIAZ, G.J. et al. The use of select plasma enzyme activities for the diagnosis of fatty liver-hemorrhagic syndrome in laying hens. **Avian Diseases**, Guelph, v.43, p.768-773, 1999.

DOERR, J.A. et al. Effects of low levels chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.62, p.1971-1977, 1983.

FARVER, T.B. Concepts of normaly in clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** San Diego: Academic Press, 1989. p. 1-19.

FUKAL, L. A rapid and simple aproach for radioimmunological determination of aflatoxin B₁ in cereals and feed using a comercial analysis kit. **Med. Vet.**, v.35, p. 117-120, 1990.

GAWAI, K. R. et al.Comparative assessment of the effect of aflatoxin B₁ on hepatic dysfunction in some mammalian and avian species. **Comp. Biochem. Physiol**, v.101C, n.2, p.415-418,1992.

HOCHLEITHNER, M. Biochemisteris. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: principles and application**, Florida:Wingers, 1994, p.229.

HOERR, F.J. Mycotoxins. In: CALNECK, B.W. et al. (Eds.) **Diseases of Poultry**, Iowa: Iowa State University Press, 199, p.884-915.

HOERR, F.J. Liver. In: RIDELL, C. **Avian histopathology**, Tallahassee: Florida, Rose Printing, 1996, 250 p..

HOWARTH, B.; WYATT, R. D..Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability, and progeny performance of broiler breeder hens. **Applied and Environmental Microbiology**, p.680-684, May 1976.

IARC. **Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans**. Lyon. 1993. v.56: Some naturally occurring substances: foods items and constituents heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, p.245-524.

JONES, F.T.; HAGLER, W.H.; HAMILTON, P. B. Association of low levels of aflatoxins in feed with productivity losses in comercial broilers operations. **Poultry Science**, v.61, p.861-868, 1982.

KERR, M. G. Enzimologia Clínica – Enzimas Plasmáticas In: KERR, M. G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária**, 2 ed. São Paulo:Roca, 2003. p. 159 – 165.

KIESSLING, K.H.; Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure & Appl. Chem.**, v.58, n.2, p.327-338, 1986.

KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical Enzymology In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed.. San Diego: Academic Press, 1997. p. 303-323.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba:editor, 1993. 65 p.

LESSON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and micotoxins**. [S.I.]: Ghelph 1995. 352 p.

LILLEHOJ, E. B. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, fusarium toxins, and zearalenone. **J. A. V. A.** , v. 163, n.11, p. 1281-1284, 1973.

LUMEIJ, J. T. Hepatology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and application**, Florida:Wingers publishing, 1994. p.522-537

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego:Academic Press, 1997. p. 857-879.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 13.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MABEE, M. S.; CHIPLEY, J. R. Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁ – ¹⁴C in broiler chickens. **Applied Microbiology**, p.763-769, May 1973.

MAURICE, D. V.; BODINE, A. B.; REHRER, N. J..Metabolic effects of low aflatoxin B₁ levels on broiler chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, p.980-984, March 1983.

OGUZ, H.; KURTOGLU, V.; BIRDANE, Y.O. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v.73, p.101-103, 2002.

OSTROWSKI-MEISSNER, H. T..Biochemical and physiological responses of growing chickens and duckling to dietary aflatoxins. **Comp. biochem. Physiol**, v.79C, n.1, p.193-204, 1984.

PATTERSON, D. S. P. Aflatoxin in farm animals. **Vet. Res. Commum**, v.7, p. 135-145, 1983.

PESKA, J. J. Enhanced surveillance of foodborn mycotoxins by immunochemical assay. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.71, n.6, p. 1075-1081, 1988.

RODRIGUES, O. **Detecção de Aflatoxina B₁ e Ocratoxina A no organismo de frangos de corte, através do emprego do Ensaio Imuno-enzimático utilizando Anticorpos monoclonais (ELISA)**. 1996. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

SALLE, C. T. P. et al. Detecção de aflatoxina B₁ no organismo de frangos de corte através de anticorpos monoclonais medidos pelo ensaio imuno-enzimático(ELISA). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA,1., ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Centro de Micologia e Micotoxicologia-UFRRJ, 1994a, p. 98-102.

SWICK, R.A. Hepatic metabolism and bioactivation of mycotoxin and plant toxins. **Journal of Animal Science**, v.58, n.4, p.1017-1028, 1984.

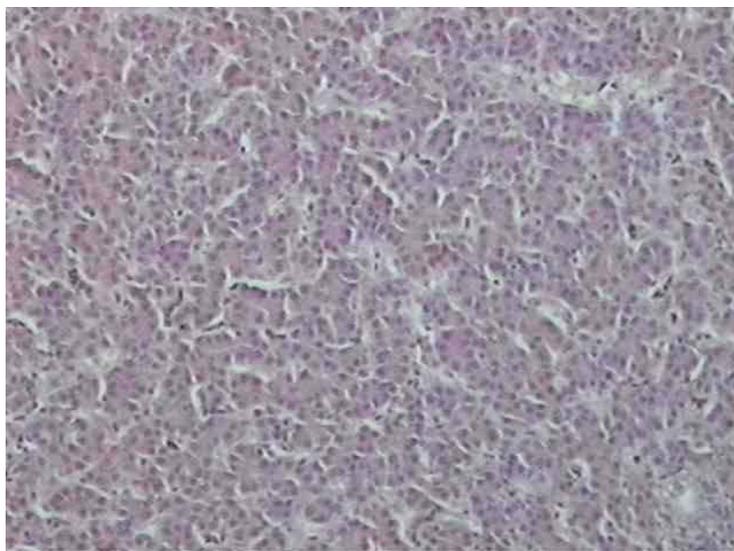
SMITH, J.W.; HAMILTON, P. B. Aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science**, v. 49, p. 207-215, 1970.

TENNANT, B. C. Hepatic Function In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed.. San Diego:Academic Press, 1997. p.327-349.

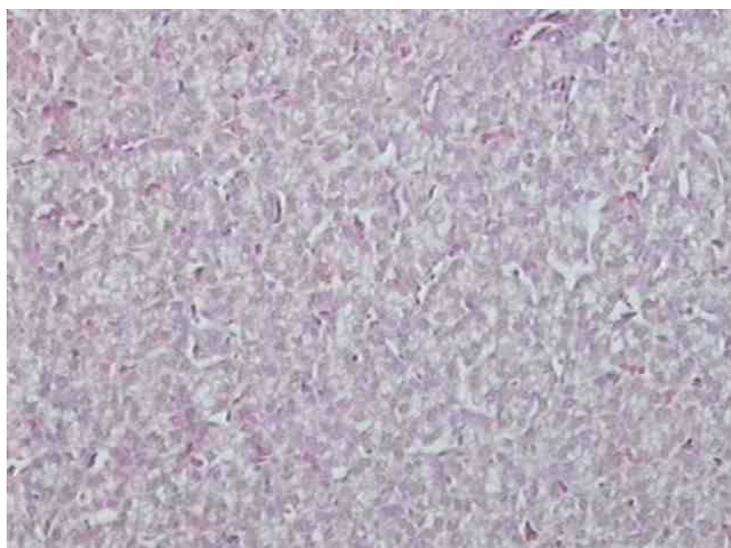
THAXTON, P.; TUNG, H. T.; HAMILTON, P. B. Immonosupession in chickens by aflatoxin. **Poultry Science**, v. 53, 1974, p.721-725.

WOOD, G.E. Mycotoxins in foods in the United States. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3941-3949, 1992.

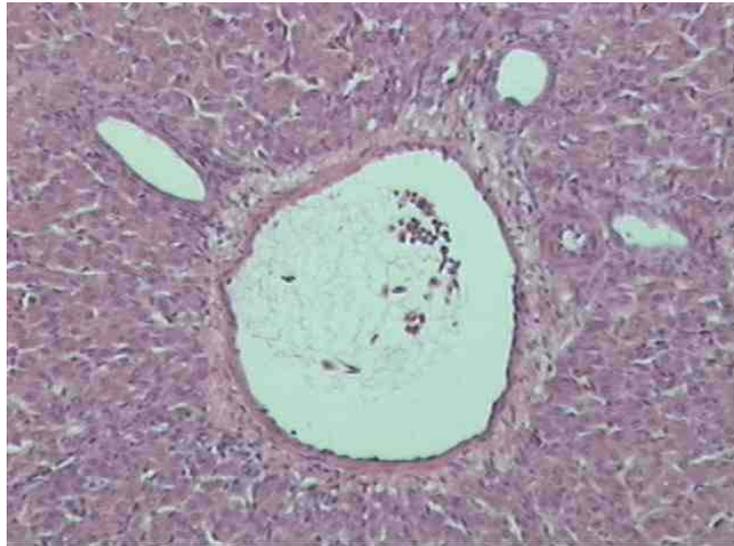
ANEXO A - Escores de lesões histopatológicas para cada tipo de lesão detectada



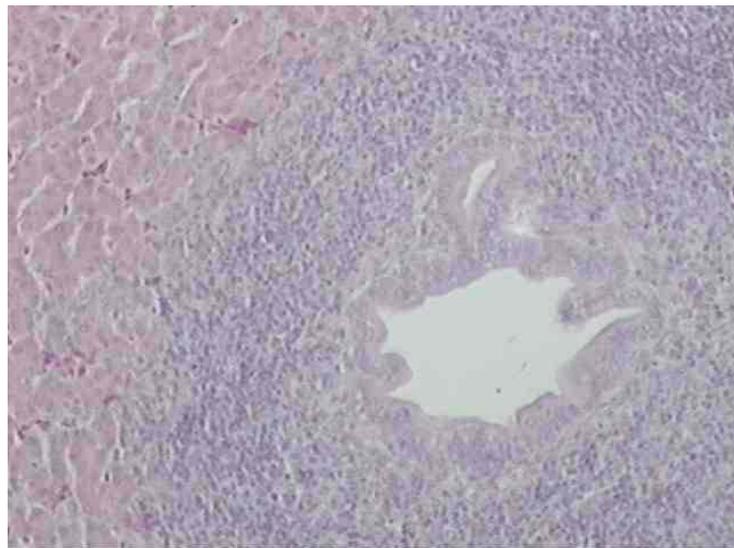
Escore 1 de necrose e vacuolização



Escore 4 de vacuolização e necrose



Escore 1 de hiperplasia de ductos biliares e infiltração periportal de células inflamatórias



Escore 4 de hiperplasia de ductos biliares e infiltração periportal de células inflamatórias