

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

**Interação entre Lipopolissacarídeo de *Salmonella Typhimurium* e
Fumonisina B₁ em frangos de corte**

**Autor: Ricardo Hummes Rauber
Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento**

**PORTO ALEGRE
2012**

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

**Interação entre Lipopolissacarídeo de *Salmonella Typhimurium* e
Fumonisina B₁ em frangos de corte**

Autor: Ricardo Hummes Rauber

**Tese apresentada como requisito
Parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Medicina Veterinária
Preventiva.**

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

**PORTO ALEGRE
2012**

CIP - Catalogação na Publicação

Rauber, Ricardo Hummes

Interação entre Lipopolissacarídeo de *Salmonella Typhimurium* e *Fumonisina B1* em frangos de corte / Ricardo Hummes Rauber. -- 2012.

102 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Sanidade Avícola. 2. *Salmonella*: Avicultura. 3. Lipopolissacarídeo: Avicultura. 4. *Fumonisina*: Avicultura. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao Prof. Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela oportunidade e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Flávio e Vera, pelo apoio incondicional, pelos conselhos e pelo exemplo de vida.

À minha noiva, Gabriela, pelo apoio durante esta jornada e pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha irmã, Marina, pela acolhida, nas minhas idas e vindas para cumprir com meus compromissos acadêmicos em Porto Alegre.

Ao meu irmão, César, pelo companheirismo, mesmo que estando longe.

Aos colegas do Instituto SAMITEC, Leandro, Vinícius, André, Diego, Camila, Lidiane e Solange, e do LAMIC, Paulo, Adriano, Alexandre e Maurício, pelo auxílio durante a execução do experimento, nas análises e na redação dos artigos.

Ao Prof. David Driemeier e sua equipe do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, pela disposição em realizar as avaliações histológicas.

À Dra. Anderlise Borsoi, pela disponibilidade em realizar as avaliações de morfologia intestinal.

Aos membros da banca, Prof. Carlos Augusto Mallmann, Dr. Ivomar Oldoni e Prof. Hamilton Luiz de Souza Moraes, pelas estimadas contribuições prestadas na qualificação do projeto e pela oportunidade de discutir os resultados deste trabalho na defesa da Tese.

E a todos que tiveram participação, direta ou indireta, na realização deste trabalho,

Muito obrigado.

Interação entre Lipopolissacarídeo de *Salmonella* Typhimurium e Fumonisina B₁ em frangos de corte

Ricardo Hummes Rauber

Aprovada em 24 de setembro de 2012.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM
Membro da Comissão

Dr. Ivomar Oldoni
Brasil Foods S.A. - BRF
Membro da Comissão

RESUMO

Lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, sendo liberado durante a divisão celular ou morte da bactéria após lise. O LPS é um dos mais potentes ativadores do sistema imune, desencadeando uma resposta inflamatória inespecífica. A exposição ao LPS tem sido associada a uma gama de efeitos tóxicos em frangos e outras aves, como hipertermia, inflamação, caquexia e, eventualmente, morte. A fumonisina B₁ (FB), um metabólito secundário produzido pelo *Fusarium verticilloides*, tem sido descrita como causa de doenças previamente conhecidas (leucoencefalomalácea equina e edema pulmonar suíno), bem como causando alguns efeitos em aves. Os principais sinais clínicos da intoxicação por FB em frangos são desempenho reduzido, ascite, edema e congestão dos rins, diarreia, peso relativo do fígado aumentado e mortalidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos individuais e combinados do LPS de *Salmonella Typhimurium* (sLPS) e FB sobre o desempenho produtivo (peso corporal [PC], consumo de ração [CR] e conversão alimentar [C]), peso relativo de fígado (PRF), parâmetros biológicos (proteínas plasmáticas totais [PPT], albumina [Alb], cálcio [Ca], triglicerídeos [Tri], colesterol total [Col], fósforo [P], ácido úrico [AU], proteína C-reativa [CRP], alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST], fosfatase alcalina [FA], gama glutamiltransferase [GGT] e relação esfinganina/esfingosina [SA:SO]), avaliação morfológica do intestino delgado (altura de vilosidades [AV], profundidade de criptas [PC] e relação vilosidade/crypta [V:C]) e avaliações histológicas de vários tecidos de 432 frangos de corte, machos, com um dia de idade, divididos em nove tratamentos, conforme a dose de FB (0, 100 ou 200 mg/kg, do primeiro ao 28º dia de experimento) e sLPS (0, 250 ou 500 µg/ave por aplicação, a cada 48 horas, do 15º ao 27º dia). Ao final do experimento (28 dias): efeitos significativos do sLPS foram observados sobre PC, Ca, Col, P, AU, CRP, AST, FA e AV; efeitos significativos da FB foram observados sobre PC, CR, C, PRF, PPT, Alb, Ca, Tri, Col, AU, CRP, ALT, GGT, SA:SO, AV e V:C; efeitos significativos da interação sLPS*FB foram observados sobre PRF, Alb, Col, P, AU e CRP. Alterações histológicas foram observadas para sLPS, FB e sLPS*FB no fígado e rins. De acordo com estes resultados, sLPS e FB (isolados ou associados) determinam efeitos sobre o desempenho e parâmetros biológicos de frangos de corte.

Palavras-chave: lipopolissacarídeo, *Salmonella Typhimurium*, fumonisina, frango, desempenho, patologia clínica.

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) is the main component of Gram-negative bacterial cell wall, and is released during cellular division or bacterial death after lysis. This is one of the most powerful activators of the immune system, leading to a non-specific inflammatory response. LPS exposure has been related to a role of effects in broilers and other avian species, such as hyperthermia, inflammation, cachexia, and eventually, death. Fumonisin B₁ (FB), a secondary metabolite produced by *Fusarium verticilloides*, has been shown to be associated to some previously known diseases or syndromes (equine leucoencephalomalacia and porcine pulmonary edema) and has also been described as causing some effects in poultry. The main clinical signs of FB intoxication in broilers are reduced productive performance, ascites, kidney edema and congestion, diarrhea, increased relative weight of the liver, and mortality. The aim of this research was to evaluate the individual and combined effects of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide (sLPS) and FB on performance (body weight, feed intake, and feed conversion rate), relative weight of the liver, biological parameters (total plasma proteins [TPP], albumin [Alb], calcium [Ca], triglycerides [Tri], total cholesterol [Col], phosphorus [Ph], uric acid [UA], C-reactive protein [CRP], alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST], alkaline phosphatase [AP], gamma glutamyltransferase [GGT] and sphinganine-to-sphingosine [SA:SO] ratio), morphological evaluation of jejunum/ileum (villous height [VH], crypt depth [CD], and villous-to-crypt [V:C] ratio), and histological evaluation of several tissues from 432 day-old male broiler chickens divided into nine treatments according to the dose of FB (0, 100, or 200 mg/kg, from day 1 to day 28) and sLPS (0, 250, or 500 µg/application/bird, every other day, from day 15 do day 27). At the end of the experiment (28 d), significant effects of: sLPS were observed on BW, Ca, Col, Ph, UA, CRP, AST, AP, and VH; FB were observed on BW, FI, FCR, RWL, TPP, Alb, Ca, Tri, Col, UA, CRP, ALT, GGT, SA:SO, VH, and V:C; Interaction sLPS*FB were observed on RWL, Alb, Col, Ph, UA, and CRP. Histopathological evaluations showed significant lesions in liver and kidney caused by sLPS, FB and their association. According to these results, both sLPS and FB (isolated or associated) determine significant effects on performance and biological parameters of broilers at 28 days of age.

Key Words: lipopolysaccharide, *Salmonella* Typhimurium, fumonisin, broiler, performance, clinical pathology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Produção de carne de frango (em milhões de toneladas), conforme o país, no período de 2003 a 2010 (UBABEF, 1012).	16
FIGURA 2 - Exportação de carne de frango (em milhões de toneladas), conforme o país, no período de 2003 a 2010 (UBABEF, 2012).	17
FIGURA 3 - Representação esquemática das diferenças estruturais entre as paredes de bactérias gram-positivas (a) e gram-negativas (b) (ALTERTHUM, 2008).	20
FIGURA 4 - Estrutura básica do lipopolissacarídeo bacteriano (PIAZZA et al., 2008).	20
FIGURA 5 - Mecanismo básico de ação do LPS (adaptado de TIZARD, 2008).	21
FIGURA 6 - Estrutura química da fumonisina B ₁ (adaptado de HUSSEIN & BRASEL, 2001).	27
FIGURA 7 - Fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados à produção de micotoxinas (adaptado de MALLMANN et al., 2009).	28
FIGURA 8 - Mecanismo de inibição da formação de esfingolipídeos pela fumonisina (adaptado de MALLMANN & DILKIN, 2007).	30
FIGURE 9 - Microscopic aspect of liver from broilers receiving no sLPS (A) and 500 µg of sLPS (B).	43
FIGURE 10 - Microscopic aspect of kidneys from broilers receiving no sLPS (A) and 500 µg of sLPS (B).	43
FIGURE 11 - Microscopic aspect of liver from broilers receiving 0 mg/kg (A) or 200 mg/kg (B) of FB.	55
FIGURE 12 - Microscopic aspect of kidneys from broilers receiving 0 mg/kg (A) or 200 mg/kg (B) of FB	55
FIGURE 13 - Microscopic aspect of kidneys from broilers of the control group (A) or receiving 500 µg of sLPS (B), 200 mg/kg of FB (C) or the association of sLPS and FB (D).	71

FIGURE 14 - Microscopic aspect of liver from broilers of the control group (A) or receiving 500 µg of SLPS (B), 200 mg/kg of FB (C) or the association of sLPS and FB (D).	71
FIGURA 15 - Limites inferior e superior de temperatura de conforto térmico para frangos de corte, conforme a idade, e temperatura ambiental observada (leitura) durante o experimento.	84

LISTA DE TABELAS

As tabelas são apresentadas em uma numeração consecutiva, conforme a sequencia em que aparecem no decorrer da Tese. Nos artigos submetidos às revistas científicas, a numeração é individual em cada artigo.

TABELA 1 - Principais micotoxinas, fungos produtores e alimentos mais contaminados, de interesse na avicultura	25
TABLE 2 - Performance of male broiler chicks receiving <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide, every other day, from 15 to 27 days of age.....	46
TABLE 3 - Serum levels of total cholesterol, phosphorus, and uric acid of male broiler chicks receiving <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide, every other day, from 15 to 27 days of age.....	47
TABLE 4 - Serum levels of aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, and C-reactive protein of male broiler chicks receiving <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide, every other day, from 15 to 27 days of age.....	48
TABLE 5 - Performance of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B ₁ contaminated feed during 28 days.....	59
TABLE 6 - Relative weight of liver, serum levels of total plasma proteins and albumin of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B ₁ contaminated feed during 28 days.....	60
TABLE 7 - Serum levels of calcium, phosphorus, and uric acid of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B ₁ contaminated feed during 28 days.	61
TABLE 8 - Serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and gamma glutamyltransferase of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B ₁ contaminated feed during 28 days.	62

TABLE 9 -	Serum levels of total cholesterol and triglycerides, at 14 and 28 days, serum sphinganine-to-sphingosine ratio and serum levels of C-reactive protein at 28 days of age, of male broiler chickens fed fumonisin B ₁ contaminated feed during 28 days.....	63
TABLE 10 -	Measurements of villous height, crypt depth, and villous-to-crypt ratio at 28 days of age, of male broiler chickens fed fumonisin B ₁ contaminated feed during 28 days.....	64
TABLE 11 -	Performance and relative weight of liver of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B ₁	78
TABLE 12 -	Serum levels of total plasma protein, albumin, calcium, and triglyceride of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B ₁	79
TABLE 13 -	Serum levels of total cholesterol, phosphorus, uric acid, and C-reactive protein of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B ₁	80
TABLE 14 -	Serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase, and sphinganine-to-sphingosine ratio of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B ₁	81
TABLE 15 -	Measurements of villous height, crypt depth, and villous-to-crypt ration of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of <i>Salmonella</i> Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B ₁	82

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.	Comprovante de submissão de artigo científico SA 677 2012 ao periódico Brazilian Journal of Poultry Science, em 15 de junho de 2012.....	95
ANEXO 2.	Comprovante de submissão de artigo científico CAVP-2012-0116 ao periódico Avian Pathology, em 14 de agosto de 2012.....	97
ANEXO 3.	Comprovante de submissão de artigo científico PS-12-02489 ao periódico Poultry Science, em 21 de maio de 2012.....	99
ANEXO 4.	Comprovante de aceite do artigo científico PS-12-02489 no periódico Poultry Science, em 12 de agosto de 2012.....	101

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. LIPOPOLISSACARÍDEO.....	19
2.1.1. <i>Conceito</i>	19
2.1.2. <i>Mecanismo de ação do LPS.....</i>	21
2.1.3. <i>Presença de LPS no ambiente do aviário</i>	23
2.2. MICOTOXINAS.....	25
2.3. FUMONISINAS	26
2.3.1. <i>Conceito</i>	26
2.3.2. <i>Produção das fumonisinas nos alimentos e incidência em ração e ingredientes para rações.....</i>	27
2.3.3. <i>Toxicocinética e mecanismo de ação das fumonisinas.....</i>	29
2.3.4. <i>Impacto das fumonisinas na produção avícola.....</i>	31
2.4. BIOQUÍMICA CLÍNICA	32
2.4.1. <i>Proteínas séricas.....</i>	32
2.4.2. <i>Colesterol e triglicerídeos.....</i>	33
2.4.3. <i>Ácido úrico, cálcio e fósforo</i>	33
2.4.4. <i>Enzimologia clínica.....</i>	34
2.5. PROTEÍNA C-REATIVA	36
3. INTERFERENCE OF <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> LIPOPOLYSACCHARIDE ON PERFORMANCE AND BIOLOGICAL PARAMETERS OF BROILER CHICKENS	38
3.1. ABSTRACT	38
3.2. INTRODUCTION	39
3.3. MATERIAL AND METHODS	39
3.4. RESULTS AND DISCUSSION	41
3.5. CONCLUSIONS.....	44
3.6. REFERENCES.....	44

4. EFFECTS OF FUMONISIN B₁ ON SELECTED PATHOLOGICAL RESPONSES AND PERFORMANCE OF BROILER CHICKENS.....	49
4.1. ABSTRACT	49
4.2. INTRODUCTION	50
4.3. MATERIAL AND METHODS	50
4.3.1. <i>Experimental animals and protocol</i>	50
4.3.2. <i>Experimental diets</i>	51
4.3.3. <i>Performance evaluation</i>	51
4.3.4. <i>Sample collection</i>	51
4.3.5. <i>Serum sample analysis</i>	52
4.3.6. <i>Statistical analysis</i>	52
4.4. RESULTS AND DISCUSSION	53
4.4.1. <i>Performance</i>	53
4.4.2. <i>Serum analyses</i>	53
4.4.3. <i>Pathological findings</i>	54
4.5. CONCLUSIONS.....	56
4.6. REFERENCES.....	56
5. INDIVIDUAL AND COMBINED EFFECTS OF SALMONELLA TYPHIMURIUM LIPOPOLYSACCHARIDE AND FUMONISIN B₁ IN BROILER CHICKENS.....	65
5.1. ABSTRACT	65
5.2. INTRODUCTION	66
5.3. MATERIAL AND METHODS	66
5.3.1. <i>Feed Preparation and Mycotoxin</i>	66
5.3.2. <i>Salmonella Typhimurium Lipopolysaccharide</i>	67
5.3.3. <i>Animals and Experimental Protocol</i>	67
5.3.4. <i>Body Performance</i>	67
5.3.5. <i>Necropsies and Pathologic Studies</i>	68
5.3.6. <i>Serum Analysis</i>	68
5.3.7. <i>Statistical Analysis</i>	69
5.4. RESULTS	69
5.5. DISCUSSION	72

5.6. CONCLUSIONS.....	75
5.7. REFERENCES.....	75
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7. CONCLUSÕES	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
9. ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem experimentando uma evolução considerável nos últimos anos. Atualmente, o país é o terceiro em nível mundial na produção de carne de frango, ficando apenas atrás de Estados Unidos e China (Figura 1). O Brasil passou a ser o maior exportador mundial de carne de frango, a partir do ano de 2004 e, de lá para cá, tem mantido esta condição (Figura 2). Alguns fatores globais podem ter contribuído para este fato, como a ocorrência de surtos de Influenza Aviária em vários países com expressiva produção avícola, o que limita as possibilidades de exportação de produtos deste setor para outros países, e a manutenção do status do Brasil como livre desta enfermidade. No entanto, o ponto principal para esta evolução da avicultura brasileira no mercado internacional é a grande preocupação dos profissionais e empresas do setor em manter e aprimorar aspectos de biosseguridade, qualidade genética dos plantéis, sanidade, nutrição e manejo aplicados à produção de aves e ovos.

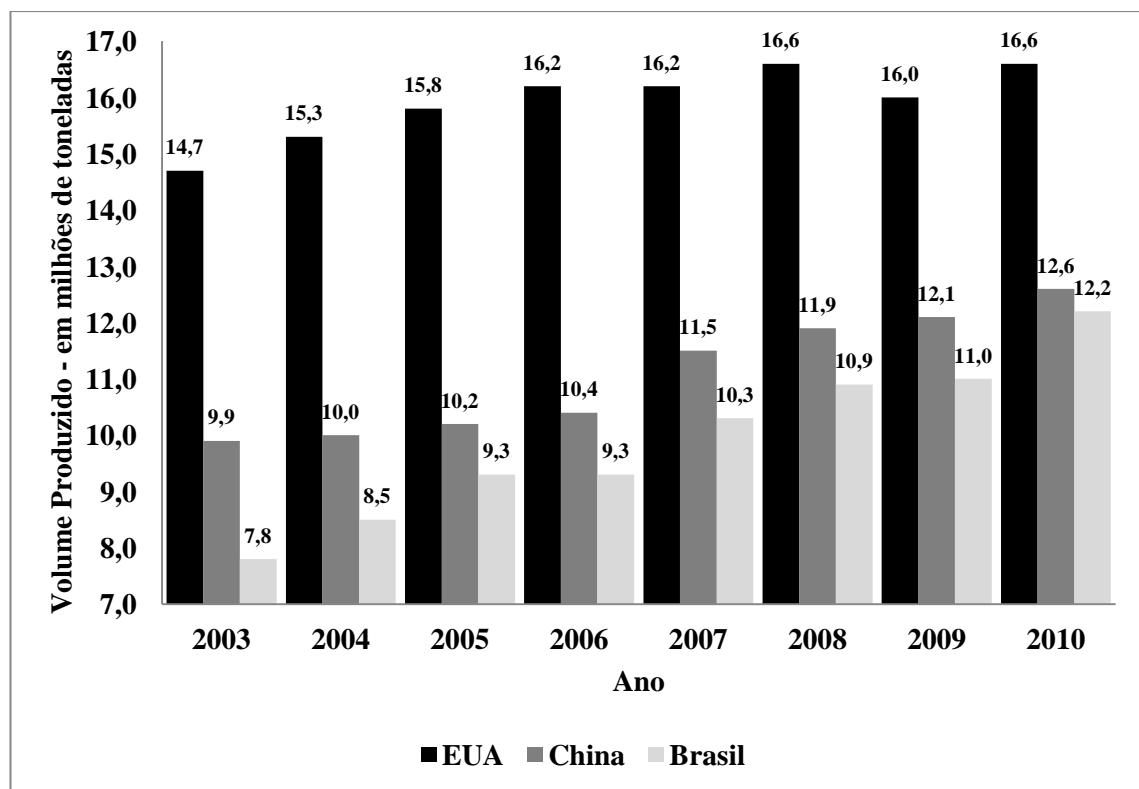


FIGURA 1 - Produção de carne de frango (em milhões de toneladas), conforme o país, no período de 2003 a 2010 (UBABEF, 2012).

O ambiente do aviário sempre foi um meio adequado para a manutenção e até mesmo multiplicação de várias espécies bacterianas. O grande mérito das medidas

adotadas atualmente, do ponto de vista sanitário, é manter a população de aves livre das doenças que estas bactérias causam, apesar das recentes restrições em relação ao uso de agentes antimicrobianos, mesmo que estes microrganismos se perpetuem no ambiente de produção. Em que pese este controle intenso e bem sucedido, a destruição de células bacterianas Gram-negativas gera a liberação, seja no ambiente ou no organismo da própria ave, de componentes de sua estrutura que atuam como toxinas (Endotoxinas ou Lipopolissacarídeos [LPS]). A presença constante do LPS no ambiente e no organismo das aves representa sérios riscos à saúde das mesmas, uma vez que desencadeia uma reação inflamatória, muitas vezes severa, podendo interferir negativamente com o desempenho do lote e, inclusive, predispor à ocorrência de enfermidades graves.

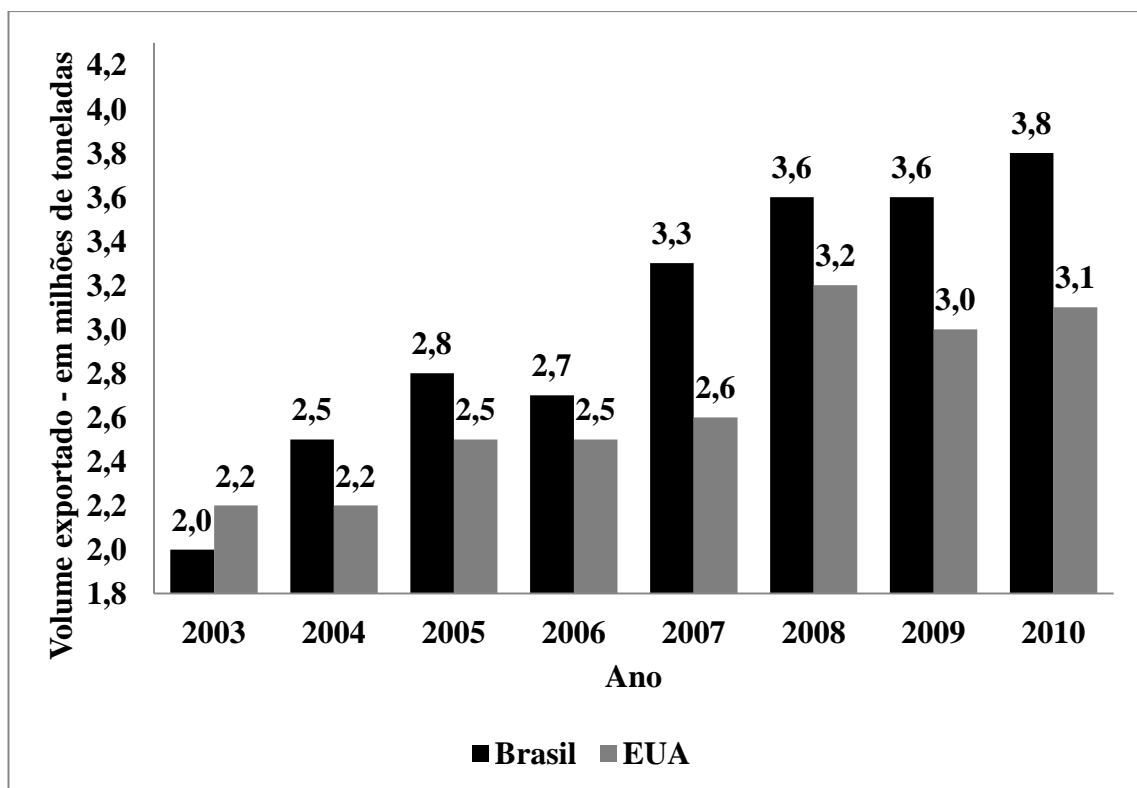


FIGURA 2 - Exportação de carne de frango (em milhões de toneladas), conforme o país, no período de 2003 a 2010 (UBABEF, 2012).

As fumonisinas, micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (principalmente *F. verticilloides*), têm sua importância para a produção de suínos e criação de equinos descrita e caracterizada há algumas décadas. No entanto, em aves, a preocupação com estas micotoxinas apenas tomou importância há poucos anos. Sendo um constante contaminante de cereais, dentre os quais merece atenção o milho, as fumonisinas têm sido associadas à ocorrência de alguns quadros, clínicos ou subclínicos, na produção avícola comercial, sem que se tenha conseguido caracterizar

de fato os sinais clínicos causados por esta micotoxicose. De um modo geral, parece haver um consenso na indústria avícola de que a importância das fumonisinas na produção avícola toma forma no sentido de ser um facilitador para a ocorrência de outras enfermidades (tóxicas ou infecciosas) ou mesmo de necessitar um agente secundário para a expressão dos seus efeitos tóxicos.

Diante desta realidade, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos tóxicos, isolados ou em associação, da inoculação de Lipopolissacarídeo de *Salmonella Typhimurium* (sLPS) e da intoxicação com Fumonisina B₁ (FB), sobre parâmetros produtivos, histológicos e bioquímicos, em frangos de corte, até os 28 dias de vida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. LIPOPOLISSACARÍDEO

2.1.1. Conceito

Lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas, cobrindo aproximadamente 30 a 40% da superfície bacteriana (TUIN, 2007). Segundo Roth et al. (1997), as bactérias gram-negativas contêm e liberam endotoxinas, das quais o principal componente é o LPS. Normalmente, quando o termo “endotoxinas” é citado pela literatura, a referência é feita especificamente ao LPS.

As toxinas bacterianas, quanto a sua estrutura química, podem ser classificadas em duas categorias: proteínas e lipopolissacarídeos (LPS). As toxinas de natureza protéica são produzidas pelas bactérias, sendo excretadas por estas no meio circulante ou então liberadas na lise celular, sendo denominadas exotoxinas. Os LPS são componentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Figura 3) e, por serem componentes da estrutura celular liberadas na lise bacteriana, são denominados endotoxinas (BENITES & MELVILLE, 2008).

A estrutura específica do LPS (Figura 4) difere em cada cepa bacteriana. No entanto, de um modo geral, estas substâncias têm uma estrutura molecular semelhante (TUIN, 2007). Cada molécula pode ser dividida em: Lipídio A, Núcleo Interno, Núcleo Externo e Antígeno O (LIEBERS et al., 2008; TUIN, 2007). O Lipídio A é um ácido graxo de cadeia longa. Os Núcleos Externo e Interno são formados por cadeias de açúcares. Estas estruturas são idênticas em todas as células bacterianas gram-negativas. A porção variável cabe ao Antígeno O, que consiste de uma cadeia de carboidratos e, por sua variabilidade, é utilizado para sorotipar e diferenciar as bactérias (FERNANDES, 2005). A toxicidade dos LPS está mais intimamente relacionada ao Lipídio A, enquanto a imunogenicidade está relacionada ao Antígeno O (LIEBERS et al., 2008; TUIN, 2007).

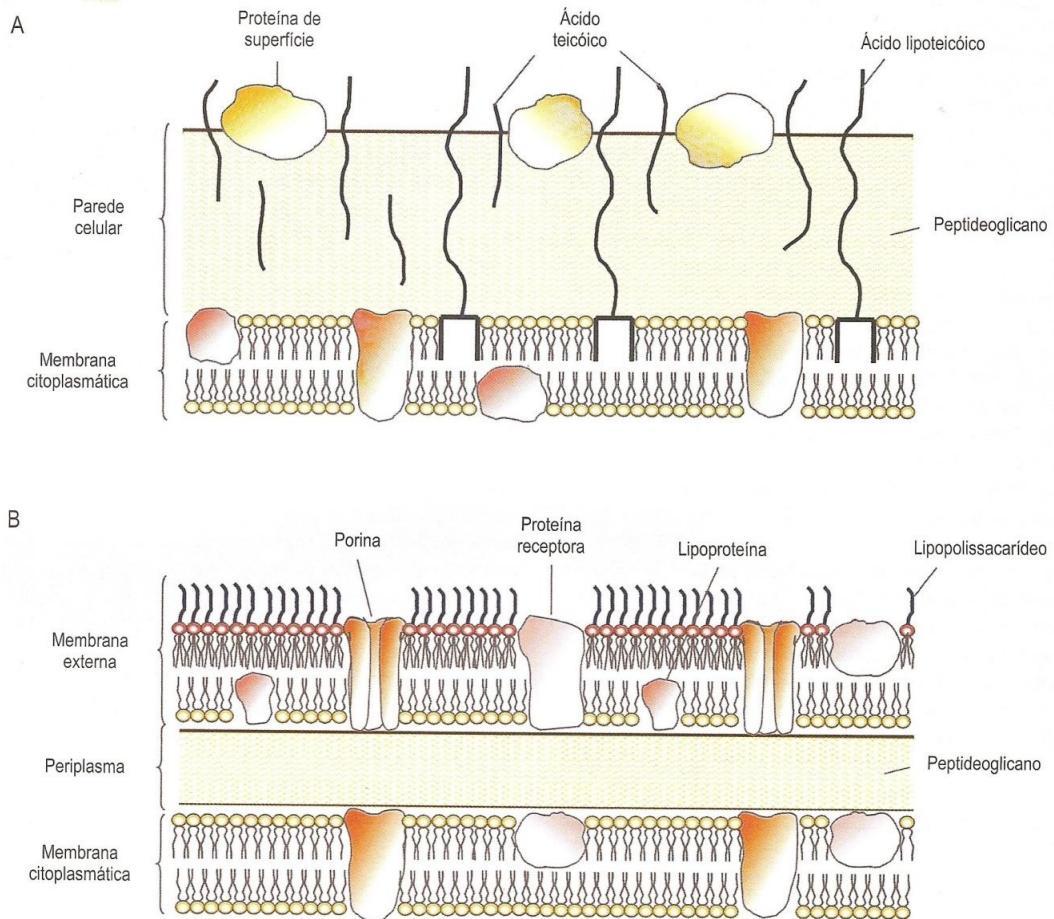


FIGURA 3 - Representação esquemática das diferenças estruturais entre as paredes de bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B) (ALTERTHUM, 2008).

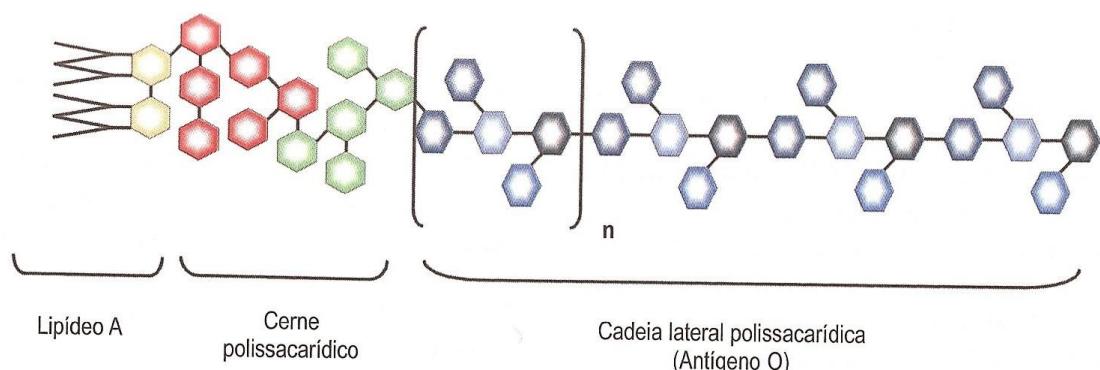


FIGURA 4 - Estrutura básica do Lipopolissacarídeo bacteriano (PIAZZA et al., 2008).

O LPS bacteriano é um dos mais potentes ativadores do sistema imune. Sua liberação da camada externa da parede bacteriana se dá durante o crescimento (divisão) celular ou como resultado de ação antibacteriana, seja por parte do hospedeiro,

ou pela utilização de drogas bactericidas (MUELLER et al., 2004; LUYENDYK et al., 2002). Quando comparadas às exotoxinas, pode-se afirmar que as endotoxinas são menos específicas em seu mecanismo de ação, termoestáveis e não podem ser convertidas em toxóides (BENITES & MELVILLE, 2008).

2.1.2. Mecanismo de ação do LPS

Quando LPS é liberado e/ou absorvido pelo organismo, uma série de células e eventos celulares são ativadas, dando início à reação inflamatória (LIEBERS et al., 2008). A intensidade desta reação depende do tipo de LPS envolvido, mas também é influenciado pelo tempo de exposição, concentração de LPS, sensibilidade genética do hospedeiro e da presença de infecção bacteriana e/ou viral concomitante (LIEBERS et al., 2008; GUAIUME, 2005). A Figura 5 demonstra, de modo esquemático, o mecanismo básico de ação do LPS.

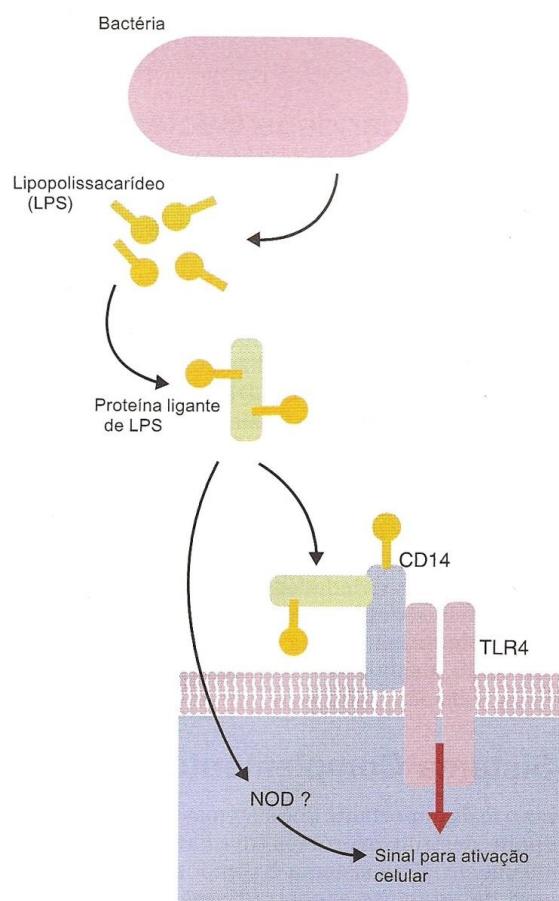


FIGURA 5 - Mecanismo básico de ação do LPS (Adaptado de TIZARD, 2008).

Acredita-se que, em baixas concentrações, o LPS liberado pela célula bacteriana ajude a compor uma resposta protetora, caracterizada por hipertermia, vasodilatação e ativação das respostas imune e inflamatória. Em altas concentrações, como nos casos de septicemia, alguns dos efeitos se intensificam, levando o hospedeiro ao choque, que pode ser mortal (PIAZZA et al., 2008).

Apesar de os efeitos da exposição ao LPS apresentarem certa variação em função de algumas condições, está claro que alguns dos efeitos adversos importantes do LPS são dependentes de mediadores endógenos, gerados pelo hospedeiro em resposta à exposição ao LPS (GUAIUME, 2005). Várias moléculas estão envolvidas na ativação das células pelo LPS. Inicialmente, ocorre a ligação do LPS com uma proteína, no plasma, por isso chamada de Proteína Ligadora de LPS (LBP). Esta é uma proteína de fase aguda, produzida principalmente pelo hepatócito, mas também pode ser produzida, mesmo que em pequenas quantidades, nas células tipo II do epitélio respiratório e no pulmão (TUIN, 2007). A presença de soro em cultura de células aumentou a intensidade dos danos em células endoteliais, sugerindo que este efeito pode ser alterado pela presença de LBP (GUAIUME, 2005).

Após a formação do complexo LBP-LPS, este se liga a uma glicoproteína CD14. Esta molécula apresenta-se em duas formas: uma ligada à membrana de células e outra livre, presente no soro. A forma ligada a células é encontrada em macrófagos, monócitos e neutrófilos, é conhecida como CD14 e está normalmente ancorada à membrana através da Glicerol-fosfatidil inositol (GPI). A forma livre, encontrada no soro, tem por função ativar células que não expressam esta glicoproteína como, por exemplo, células endoteliais, epiteliais, dendríticas, fibroblastos, células do músculo liso e do endotélio vascular. Esta forma é conhecida como sCD14 (TUIN, 2007; FERNANDES, 2005).

Em ambos os casos (CD14 e sCD14), a ligação LPS-CD14 é facilitada pela LBP, que atua como uma proteína de transferência (GUAIUME, 2005). Além de sinalizar a presença do complexo LPS-LBP, o CD14 funciona como uma proteína de superfície, mediando a internalização do LPS, através de um mecanismo que envolve, entre outros fatores, uma família de receptores descoberta recentemente, sendo os principais envolvidos o TLR4 (toll-like receptor) e o MD-2 (myeloid differentiation-2-protein). O papel principal destes receptores é disparar as vias que irão responder pelos principais efeitos do LPS (TUIN, 2007).

Todas estas vias induzem à produção de várias citosinas e moléculas efetoras. Após o estímulo pelo LPS, os macrófagos iniciam a produção de grandes quantidades de citosinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral (TNF α) e Interleucina-6 (IL-6), dentre outros (LIEBERS et al., 2008; FERNANDES, 2005). Estes mediadores são principalmente produzidos por macrófagos, mas também os neutrófilos e células endoteliais contribuem para sua rápida elevação nos tecidos inflamados (TUIN, 2007).

O TNF α parece ser uma citosina crucial que, não só é produzida por macrófagos, mas também serve como um potente ativador de macrófagos ainda não ativados. Após ativação, os macrófagos iniciam a produção de IL-1 β e IL-6, que promovem coagulação em pequenos vasos sanguíneos (TUIN, 2007). Associado a isto, leucócitos, plaquetas e o próprio sistema complemento (C3a e C5a) reagem aumentando os níveis séricos de enzimas proteolíticas e certas substâncias vasoativas, como histamina, cininas e serotonina, resultando em acúmulo de sangue, primariamente nos pulmões e nos vasos esplênicos (GUAIUME, 2005; BENITES & MELVILLE, 2008). Como resultado, ocorre um aumento na vasoconstrição periférica, levando a uma hipoperfusão tecidual.

A ativação dos fatores da coagulação pode levar a Coagulação Intravascular Disseminada (CID), da mesma forma que a hipoperfusão tecidual pode levar à isquemia, falência de órgãos e, eventualmente, à morte, quando a função de órgãos essenciais é comprometida (TUIN, 2007; GUAIUME, 2005; FERNANDES, 2005).

Segundo Benites & Melville (2008), a inoculação de bactérias Gram-negativas vivas ou mortas, ou o LPS purificado em animais, pode desencadear um amplo espectro de reações fisiopatológicas inespecíficas, como hipertermia, alterações nas contagens de leucócitos no sangue, coagulação intravascular disseminada, hipotensão e choque. A morte pode ocorrer conforme a dose, via de administração e a espécie animal.

2.1.3. Presença de LPS no ambiente do aviário

Bactérias Gram-negativas são comuns em locais próximos a pessoas e animais. São normalmente encontradas e têm condições adequadas de sobrevivência na água, no ar e no solo. A presença de matéria orgânica, no entanto, consiste no melhor

ambiente para a manutenção da população bacteriana em um ambiente (TUIN, 2007). Nos animais, tais bactérias podem ser isoladas facilmente do conteúdo intestinal. Dentre as principais bactérias isoladas de intestinos de aves de produção, podemos citar *Salmonella* paratifóide, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Comyebacterium*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Enterobacter* e *Escherichia coli* (FERNANDES, 2005).

Uma vez presente no intestino das aves, certa quantidade de bactérias (viáveis ou não) é eliminada pelas fezes, mantendo uma carga contaminante no material da cama dos aviários. Células bacterianas rompidas, seja no intestino, seja na cama, determinam a liberação de LPS que, em última instância, estará também disponível no material fecal, perpetuando o LPS no ambiente, que pode ser inalado (quando no pó em suspensão no ambiente), ou ingerido pelo consumo de cama ou pela contaminação da ração.

Em um estudo avaliando a concentração de poeira em suspensão e endotoxinas no ambiente de um aviário com capacidade de alojamento de 22.000 frangos, durante 5 semanas, Vucemilo et al. (2008) encontraram níveis médios de poeira variando de 2,00 a 4,90 mg/m³ de ar e presença de endotoxinas variando de 6,21 a 99,40 unidades de endotoxina (EU)/m³ de ar. Na avaliação dos níveis de LPS, o valor mínimo de 6,21 EU/m³ foi observado na segunda semana do lote, sendo que o menor valor observado, excetuando-se este, foi de 54,00 EU/m³, na primeira semana.

Em outro estudo, realizado em aviários na Inglaterra, e citado por Fernandes (2005), a concentração média de LPS no ambiente do aviário variou de 119 a 719 EU/m³ de ar. Neste estudo foi constatada uma correlação positiva ($R=0,62$) entre os níveis de poeira em suspensão e a concentração de LPS no ar dos aviários.

Da mesma forma, Schierl et al. (2007), avaliaram a concentração de LPS no ar de instalações utilizadas na produção de ovos comerciais e em aviários para produção de perus de corte. A concentração de LPS variou de 21,8 a 21.933 EU/m³ nas instalações para poedeiras comerciais e de 467,1 a 5.292 EU/m³ nos aviários para perus de corte.

Uma vez que a presença prévia de bactérias gram-negativas contaminando o ambiente onde as aves estão alojadas, ou mesmo o organismo das aves, é condição *sine qua non* para a liberação do LPS no ambiente e no organismo da ave, medidas sanitárias e/ou de biosseguridade que possam reduzir a contagem de células bacterianas nestes locais têm importância na diminuição da exposição das aves às endotoxinas.

2.2. MICOTOXINAS

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte, denominado *Fungi*. Várias características diferenciam os fungos das plantas, dentre os quais, os principais são: não sintetizam qualquer pigmento fotossintético, não tem celulose na parede celular e não armazenam amido como substância de reserva (GOMPERTZ et al., 2008).

De um modo geral, os fungos podem ser encontrados em toda a parte: em vegetais, água, animais, homem, detritos e no solo. Toda e qualquer atividade metabólica requerida para o crescimento da célula fúngica é genericamente chamada de metabolismo primário, enquanto que as atividades metabólicas não essenciais para seu crescimento são chamadas de metabolismo secundário (GOMPERTZ et al., 2008). As substâncias oriundas do metabolismo fúngico secundário que apresentam potencial tóxico para animais ou para o homem são chamadas de micotoxinas e as doenças causadas por elas conhecidas como micotoxicoses. Já os fungos que produzem micotoxinas são chamados de fungos toxígenos (HUSSEIN & BRASEL, 2001; BATATINHA et al., 2008).

A ocorrência de micotoxicoses não é recente. Desde os tempos bíblicos é possível observar surtos relacionados à ingestão de alimentos possivelmente contaminados com micotoxinas. Um exemplo clássico é o episódio chamado de “Fogo de Santo Antônio”, ocorrido na Idade Média e caracterizado por surtos de gangrena na população que consumia cereais contaminados por esclerotos do fungo *Claviceps purpurea* (MALLMANN & DILKIN, 2007; BATATINHA et al., 2008). Apesar disso, somente a partir da ocorrência de um surto de aflatoxicose em perus, na época chamado de “Doença X dos Perus”, que matou mais de 100 mil perus na Inglaterra em 1960, é que o assunto “Micotoxinas” passou a ser estudado com mais cuidado (MALLMANN & DILKIN, 2007).

Atualmente, mais de 300 substâncias são conhecidas como micotoxinas. No entanto, apenas algumas apresentam interesse do ponto de vista sanitário, tanto para humanos quanto para os animais (HUSSEIN & BRASEL, 2001). A Tabela 1 apresenta as principais micotoxinas, fungos produtores e principais alimentos contaminados por estas micotoxinas para a avicultura.

TABELA 1 - Principais micotoxinas, fungos produtores e alimentos mais contaminados, de interesse na avicultura.

Micotoxina	Principais fungos produtores	Alimentos mais propensos à contaminação
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	Milho e cereais em geral
Ácido Ciclopiazônico	<i>Aspergillus flavus</i>	Milho
Tricotecenos	<i>Fusarium sp.</i>	Milho e cereais de inverno
Fumonisinas	<i>Fusarium verticilloides</i>	Milho e cereais de inverno
Ocratoxina A	<i>Aspergillus alutaceus</i> e <i>Penicillium sp.</i>	Milho e grãos estocados

Adaptado de Mallmann et al., 2009.

Tanto em humanos quanto em animais, as micotoxicoses são caracterizadas como não contagiosas, não transferíveis, não infecciosas, estritamente relacionadas à ingestão de alimento contaminado e não relacionáveis a quaisquer outros microrganismos que não fungos. Os sinais clínicos normalmente desaparecem pós a retirada do alimento contaminado (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

2.3. FUMONISINAS

2.3.1. Conceito

As fumonisinas fazem parte de um grupo de micotoxinas que passou a ser estudado apenas recentemente. Antes com pouca importância, tanto do ponto de vista da saúde humana, quanto animal, as fumonisinas passaram a ser estudadas após sua relação com surtos de leucoencefalomalácea em equinos, no final da década de 1980 (MARASAS et al., 1988).

As fumonisinas de maior ocorrência em alimentos para animais são B₁ e B₂, sendo a fumosina B₁ (FB₁) a de maior importância toxicológica. São produzidas por várias espécies de fungos dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium*, principalmente o *F. verticilloides* (VOSS et al., 2007; MALLMANN et al., 2009). Quimicamente, as fumonisinas são caracterizadas por uma cadeia longa hidrocarbonada, similar àquela dos precursores dos esfingolipídeos (esfinganina e esfingosina), presentes nas células de

mamíferos (HUSSEIN & BRASEL, 2001). A Figura 6 apresenta a estrutura química da FB₁.

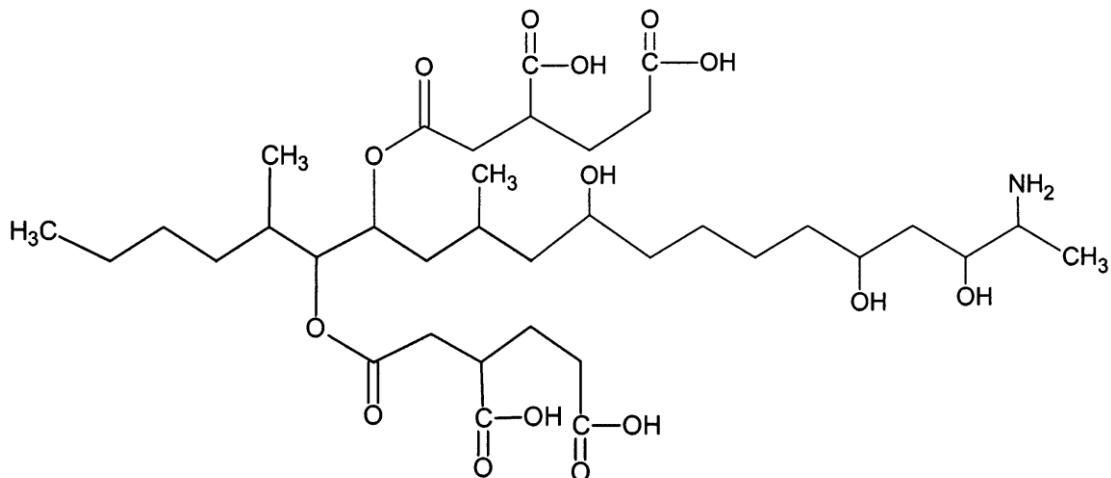


FIGURA 6 - Estrutura química da Fumonisina B₁ (Adaptado de HUSSEIN & BRASEL, 2001).

A presença de FB₁ em alimentos tem sido associada a várias síndromes, tanto em animais, quanto humanos. Em animais de produção, a FB₁ é responsável pelos quadros de leucoencefalomalácea equina (MARASAS et al., 1988) e pelo edema pulmonar em suínos (HARRISON et al., 1990), enquanto que em ratos, foi associada à ocorrência de tumores no fígado (GELDERBLOM et al., 1988). Em aves, os primeiros estudos datam do início dos anos 1990 e, aparentemente, nenhuma síndrome ou doença é atribuída à presença da FB₁ nas dietas. No entanto, danos significativos, principalmente do ponto de vista zootécnico, foram relacionados à intoxicação com FB₁ em frangos de corte (LEDOUX et al., 1992).

2.3.2. Produção das fumonisinas nos alimentos e incidência em ração e ingredientes para rações

Uma vez que os fungos têm distribuição ubiquitária, é de se esperar uma contaminação fúngica, mesmo que mínima, em praticamente todos cereais, principalmente aqueles cultivados intensivamente, como alimentos. Assumindo-se que a presença do fungo deixa de ser uma variável e passa a ser uma constante e levando em consideração que as micotoxinas tem sua produção decorrente do metabolismo

secundário dos fungos, alguns fatores são necessários para desencadear e/ou favorecer a produção de micotoxinas em uma determinada massa de grãos (Figura 7).

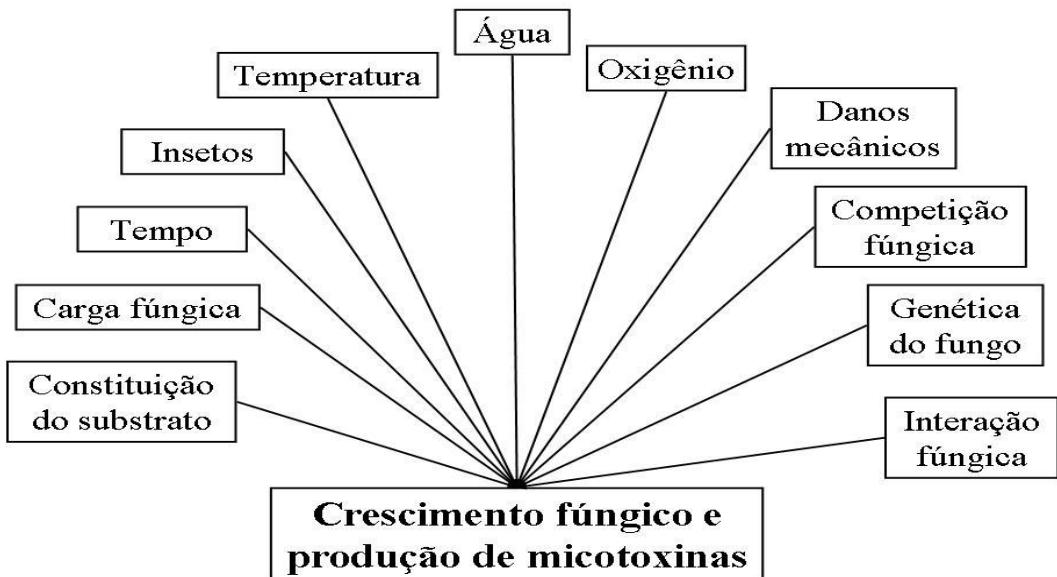


FIGURA 7 - Fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados à produção de micotoxinas (Adaptado de MALLMANN et al., 2009).

Os fungos produtores de fumonisinas (*Fusarium sp.*) se desenvolvem e têm como condições ambientais ideias para produção das micotoxinas, temperaturas entre 15 e 25° C e alto teor de umidade no substrato, com uma atividade de água superior a 0,90 (MALLMANN & DILKIN, 2007).

Atividade de água é um conceito químico, definido como a relação entre a pressão de vapor de um determinado material e a pressão de vapor de água pura, nas mesmas condições, sendo que os valores de atividade de água oscilam entre 0 e 1 (GOMPERTZ et al., 2008).

De um modo geral, todo cereal cultivado pode apresentar contaminação por fumonisinas. No entanto, devido à grande inclusão do milho (de 50 a 65%, em média) nas dietas balanceadas para animais de produção, principalmente aves e suíños, este é o principal cereal, do ponto de vista epidemiológico, em termos de contaminação por fumonisinas. Além disso, resultados de análises de fumonisinas ($B_1 + B_2$) de amostras enviadas ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM) apontam o milho como produto analisado com maiores índices de contaminação por estas micotoxinas. No período de 2007 a 2011,

19.914 amostras de milho foram analisadas, das quais 82% foram positivas, com uma contaminação média de 2,66 mg/kg nas amostras contaminadas e 2,19 mg/kg de contaminação média geral. No mesmo período, 10.187 amostras de ração destinadas à alimentação de animais de produção foram analisadas para quantificação de fumonisinas, das quais 79% apresentaram resultado positivo, com uma contaminação média de 1,93 mg/kg nas amostras positivas e 1,53 mg/kg de contaminação média geral (LAMIC, 2012).

2.3.3. Toxicocinética e mecanismo de ação das fumonisinas

A biodisponibilidade das fumonisinas é relativamente baixa, quando administrada pela via oral. Em suínos, a taxa de absorção da FB₁ é de 3 a 6% (MALLMANN & DILKIN, 2007), enquanto que em aves fica em torno de 2% (VOSS et al., 2007). Após absorvida, a FB₁ pode ser identificada no trato gastrointestinal (papo, intestino delgado e ceco), fígado e rins, sendo que 24 horas após a ingestão de uma única dose de FB₁, nenhum resíduo é encontrado nos tecido (VOSS et al., 2007).

Conforme referido anteriormente, a estrutura química das fumonisinas é similar àquela dos precursores dos esfingolipídeos (esfinganina e esfingosina) e é esta similaridade que explica o mecanismo de ação das fumonisinas, praticamente na sua totalidade.

O mecanismo básico de ação das fumonisinas é o rompimento do metabolismo dos esfingolipídeos, através do bloqueio da enzima N-Acil Transferase (Ceramida Sintase), pela ligação da molécula de fumonisia com a enzima (MALLMANN & DILKIN, 2007; VOSS et al., 2007; BATATINHA et al., 2008). A Figura 8 apresenta de modo esquemático o mecanismo de ação das fumonisinas.

As bases esfingóides estão presentes em baixas concentrações nas células, porque a esfinganina biossintetizada é rapidamente N-acetilada com ácido graxo de cadeia longa para formar N-acilesfinganina (dihidrocera-mida). Assim, a presença de esfingosina na célula é derivada, primariamente, do *turnover* do complexo de esfingolipídios, ou de fontes dietéticas (MERRILL JR. et al., 1997a). Os esfingolipídios constituem uma classe de lipídeos de membrana, presentes em todos os organismos eucariontes e em alguns procariontes. São lipídeos estruturais e funcionais (MERRIL JR. et al., 1997b).

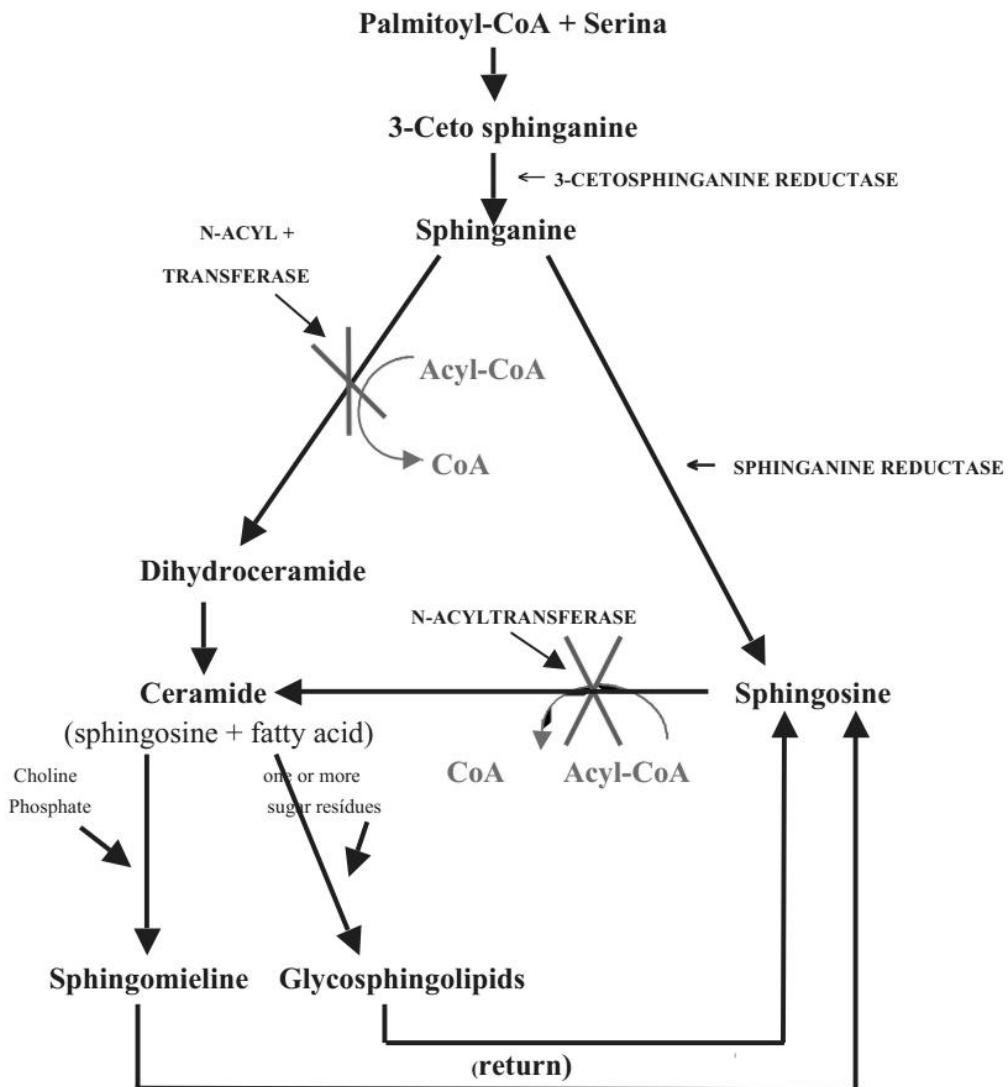


FIGURA 8 - Mecanismo de inibição da formação de esfingolipídeos pela fumonisina (adaptado de MALLMANN & DILKIN, 2007).

Acredita-se que os esfingolipídios estejam envolvidos na regulação do crescimento celular, diferenciação e transformação neoplásica, através da participação na comunicação célula a célula, na interação entre célula e substrato, além de possíveis interações entre receptores celulares e sistemas sinalizadores (WANG et al., 1991).

Os esfingolipídios bioativos são formados pelo *turnover* de esfingolipídeos complexos e como intermediários da biossíntese do metabolismo dos esfingolipídeos. Geralmente essas quantidades são altamente reguladas. Entretanto, com o bloqueio (inibição) da ceramida sintase, as fumonisinas bloqueiam a biossíntese dos esfingolipídeos complexos e causam o acúmulo de esfinganina e algumas vezes, esfingosina (MERRILL JR. et al., 2001). Assim sendo, torna-se imprescindível conhecer as vias metabólicas que poderiam ser afetadas pela inibição da enzima

ceramida sintase, a atividade biológica da esfinganina e a função dos esfingolipídeos nas células (MERRILL JR. et al., 1997a). A interrupção dessa via poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos patológicos das fumonisinas. Essas micotoxinas bloqueiam a biossíntese de esfingolipídeos complexos e causam o acúmulo de esfinganina, sendo que esse composto é tóxico para muitas células (MERRILL JR. et al., 1997b).

O acúmulo de esfinganina nas células expostas às fumonisinas pode levar à morte celular, visto que em determinados tipos celulares as bases de cadeia longa exercem efeitos citotóxicos, ou à proliferação celular, desde que para tais tipos celulares esses compostos sejam mitogênicos (WANG et al., 1991).

A FB₁ causa também apoptose em fígado e rins de ratos, além de haver evidências de que essa toxina promove necrose oncotica, especialmente em fígado. A indução da apoptose pode ser consequente à inibição da ceramida sintase e à interrupção do metabolismo dos esfingolipídeos pela FB (DRAGAN et al., 2001).

2.3.4. Impacto das fumonisinas na produção avícola

Os estudos envolvendo a ocorrência da fumonisia toxicose em aves vêm sendo desenvolvidos há alguns anos. Leeson et al. (1995) apresentam uma série de trabalhos publicados entre os anos de 1991 e 1993, nos quais os autores sugerem que as doses necessárias para que a fumonisia seja causa de perdas de produtividade em frangos de corte é maior do que aquelas comumente encontradas nos cereais.

Estudos mais recentes (MIAZZO et al, 2005; BROOMHEAD et al, 2002; KUBENA et al, 1997), mesmo utilizando doses elevadas de fumonisia, não obtiveram perdas significativas no desempenho de frangos de corte. Do mesmo modo, Hoerr (2003) apresenta os sinais clínicos de aves intoxicadas com fumonisinas, como redução no consumo de ração e no peso corporal, e descreve as doses necessárias para a ocorrência deste quadro como maiores do que aquelas encontradas nos grãos.

Apesar disso, Mallmann et al. (2009) indicam que doses de FB₁ inferiores a 50 mg/kg de ração impactam negativamente no peso de frangos de corte até 21 dias, representando perdas de 4%. Níveis de 100 mg/kg determinaram perdas de 12 a 21% no ganho de peso aos 21 dias. Essas perdas, no campo, podem ser ainda maiores, uma vez que em condições experimentais o efeito das micotoxinas é, geralmente, atenuado pela eliminação de fatores estressantes além do fato de que, no campo, os

animais podem estar submetidos a dietas deficientes e/ou com contaminação por outras micotoxinas.

Os principais efeitos descritos para a intoxicação por fumonisinas em frangos de corte são diminuição na eficiência alimentar, consumo de ração e ganho de peso, mortalidade, diarréia, ascite, hidropericardite, palidez do miocárdio, edema e congestão renal, aumento no peso relativo do fígado, proventrículo e moela, além dos efeitos sobre parâmetros fisiológicos, como alteração na relação entre esfinganina e enfingosina (SA/SO), aumento na atividade de enzimas (GGT, AST e LDH) e nos níveis de creatinina quinase e colesterol, além de diminuição nos níveis séricos de proteínas totais (MALLMANN et al., 2009; BROOMHEAD et al., 2002; KUBENA et al., 1997; ESPADA et al., 1994).

2.4. BIOQUÍMICA CLÍNICA

2.4.1. Proteínas séricas

A maioria das proteínas plasmáticas, com exceção das imunoglobulinas e dos hormônios proteicos, é sintetizada no fígado. As proteínas formam a base estrutural dos órgãos e tecidos, atuam como catalisadores (enzimas) em reações bioquímicas, tem função regulatória (hormônios) e são responsáveis pelo transporte da maioria dos componentes do plasma (HOCHLEITHNER, 1994).

A quantificação dos níveis de proteínas no soro, por si só, dificilmente leva a um diagnóstico preciso. No entanto, esta é uma análise complementar de grande valor para o diagnóstico de doenças gastrointestinais, hepáticas, renais ou infecciosas (LUMEIJ, 2008; HOCHLEITHNER, 1994).

A albumina é a mais abundante das proteínas plasmáticas, tendo sua síntese, no fígado, controlada pela pressão oncótica do plasma. A principal função da albumina é manter a pressão oncótica nos espaços intra e extravasculares. Além disso, tem como função o transporte de várias substâncias, incluindo cálcio e drogas eventualmente administradas (HARR, 2006).

De uma forma geral, tanto a quantificação das proteínas totais, quanto da fração albumina, podem auxiliar no diagnóstico de certas doenças. Diminuições nos níveis séricos de proteínas (incluindo albumina) podem indicar redução na síntese, devido a uma injúria hepática (aguda ou crônica) ou mesmo perda proteica por excesso na excreção (dano renal) ou por enteropatia. Por outro lado, aumento nos níveis

proteicos podem indicar desidratação (elevação relativa nos níveis de proteínas séricas) ou um quadro inflamatório (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

2.4.2. Colesterol e triglicerídeos

Colesterol é o principal lipídio precursor dos hormônios esteroides e ácidos biliares, bem como componente da membrana plasmática das células. É metabolizado na luz intestinal por secreções pancreáticas e intestinais e pela bile. Após absorvido, é transportado pela corrente sanguínea ligado a lipoproteínas. Sua principal fonte é dietética, pela ingestão de proteína animal, sendo também sintetizado pelo fígado (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

Triglicerídeos representam a maior forma de armazenamento de lipídios e, consequentemente, a maior fonte de energia para o corpo. São sintetizados na mucosa intestinal e no fígado, a partir de componentes lipídicos da gordura da dieta (HOCHLEITHNER, 1994).

Alterações, tanto nos níveis de colesterol, quanto nos níveis de triglicerídeos séricos, tem pouco valor diagnóstico isoladamente. No entanto, em associação com outros testes e avaliações clínicas, tais alterações podem indicar, principalmente, lesão hepática, seja por uma destruição do tecido hepático (redução nos níveis séricos destas substâncias), seja devido a uma degeneração gordurosa do fígado (com elevações nos níveis séricos). Algumas condições fisiológicas como a produção de ovos ou período pós-prandial podem determinar elevações nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

2.4.3. Ácido úrico, cálcio e fósforo

Ácido úrico é o mais significativo produto da degradação proteica nas aves, sendo a principal via de eliminação de nitrogênio nesta espécie. Este metabólito é sintetizado principalmente pelo fígado, derivado do metabolismo da purina, e eliminado a uma taxa de até 90% pelos túbulos renais (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

Os metabólitos cálcio e fósforo são oriundos única e exclusivamente da dieta. Ambos tem participação essencial na constituição dos ossos, bem como em outros processos metabólicos. O fósforo tem participação direta no armazenamento, liberação e transferência de energia e no metabolismo ácido-base. O cálcio, por outro lado,

participa ativamente na transmissão de impulsos nervosos, na permeabilidade e excitabilidade de membranas, ativação de determinadas enzimas, calcificação da casca do ovo e na contração do útero durante a oviposição (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

Do ponto de vista diagnóstico, a avaliação dos níveis séricos de ácido úrico, cálcio e fósforo podem indicar, essencialmente, dano renal, uma vez que todos são eliminados através dos rins. Devido ao fato de o ácido úrico ser sintetizado pelo fígado, uma redução nos níveis séricos deste metabólito pode indicar lesão hepática (HARR, 2006; HARR, 2002; HOCHLEITHNER, 1994).

No que diz respeito ao cálcio, deve-se prestar atenção ao fato de que uma fração do cálcio sérico normalmente se encontra ligada a proteínas no plasma (principalmente a albumina). Devido a isto, os níveis séricos de cálcio variam conforme varia a concentração de proteínas plasmáticas (HARR, 2002; HOCHLEITHNER, 1994).

Segundo Harr (2006), a correlação entre os níveis de cálcio sérico e proteínas plasmáticas e/ou albumina foi estabelecida em várias espécies de aves, no entanto, esta correlação varia conforme a espécie.

2.4.4. Enzimologia clínica

Em aves, ao contrário de mamíferos, a avaliação da atividade enzimática no soro não é utilizada de forma rotineira. De um modo geral, duas razões explicam este fato: falta de valores de referência para a maioria das aves, sejam de criações comerciais ou de aves de companhia, e ausência de especificidade das enzimas avaliadas em indicar o órgão ou tecido lesado (LUMEIJ, 2008; HARR, 2002).

Enzimas ocorrem normalmente no citoplasma, mitocôndria, núcleo ou na membrana de células por todo o organismo, onde catalisam reações específicas. A distribuição destas enzimas nos órgãos varia entre as espécies animais, variando, desta forma, também a sua interpretação conforme o tecido lesado. Geralmente, atividade enzimática elevada no soro indica dano tecidual recente, muito mais do que atividade reduzida do órgão. Algumas vezes, mesmo atividade reduzida de determinadas enzimas pode ter valor diagnóstico (LUMEIJ, 2008).

Em aves, pelo fato de não haver grande especificidade de cada enzima em relação a algum órgão, a utilização da enzimologia clínica normalmente está associada à avaliação de outros parâmetros, sejam de bioquímica clínica, ou outras avaliações clínicas e anatomo-patológicas (LUMEIJ, 2008; HARR, 2002).

Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) pertencem a um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e oxoácidos pela transferência de grupos amino. Apesar de haver várias enzimas envolvidas nesta conversão, ALT e AST são as principais, do ponto de vista clínico (HOCHLEITHNER, 1994).

O valor diagnóstico da ALT é pobre, uma vez que esta enzima é encontrada na maioria dos tecidos das aves. No entanto, elevação na atividade sérica desta enzima, normalmente indica dano celular, sem indicar o tecido lesado (HOCHLEITHNER, 1994). Já a AST apresenta certa especificidade. Apesar de ser encontrada no fígado, coração, músculo esquelético, cérebro e rins, elevações na atividade sérica desta enzima normalmente indicam lesão hepática (HARR, 2006; HARR, 2002; HOCHLEITHNER, 1994).

A fonte primária da gama glutamiltransferase (GGT) é o epitélio dos ductos biliares, podendo ser também encontrada no epitélio dos túbulos renais. A GGT tem por função catalisar a transferência do grupo γ -glutamil de um peptídeo doador para um composto receptor. Em mamíferos, além do fígado e do rim, é encontrada na membrana de todas as células, exceto as musculares. Apesar disso, a atividade elevada da GGT no soro, normalmente está associada à lesão de ductos biliares, seja em mamíferos ou em aves (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

A fosfatase alcalina (FA) tem sua atividade restrita a meios com pH alcalino. Sua atividade ainda não está totalmente elucidada, no entanto, está possivelmente envolvida na transferência de energia para trocas iônicas através da membrana celular. Esta enzima é encontrada predominantemente no duodeno e rins, sendo muito baixa a sua atividade no fígado. A maioria dos ensaios enzimáticos é utilizada para indicar dano celular e consequente liberação da enzima na corrente sanguínea. Ao contrário disto, a atividade sérica da FA elevada indica um aumento na atividade celular (e não dano), provavelmente devido a uma síntese elevada (HARR, 2006; HOCHLEITHNER, 1994).

2.5. PROTEÍNA C-REATIVA

Quando o organismo é submetido a determinados estímulos, o sistema imunológico responde de uma forma imediata, no entanto bastante inespecífica, constituindo uma resposta imune inata. Independente do estímulo, a resposta imune inata induz as células fagocíticas a produzir e liberar Interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), os precursores da inflamação (TIZARD, 2008).

Em vertebrados, a inflamação é normalmente acompanhada de uma gama de alterações sistêmicas e metabólicas, coletivamente chamadas de resposta de fase aguda. Vários estímulos podem iniciar uma resposta inflamatória de fase aguda, inclusive infecção bacteriana, cirurgia e outros traumas, fraturas, neoplasmas, queimaduras e lesões teciduais (JUUL-MADSEN et al., 2008).

Uma vez iniciada a inflamação e sob a influência da IL-1 β , do TNF- α e, principalmente da IL-6, as células hepáticas aumentam a síntese e secreção proteicas. As proteínas produzidas e secretadas nesta fase compõe um grupo de substâncias genericamente chamadas de proteínas de fase aguda, sendo a principal representante deste grupo, a Proteína C-reativa (CRP) (TIZARD, 2008; MARSELL, et al., 2005; CHAMANZA et al., 1999).

A CRP possui uma estrutura pentamérica, com duas faces. Uma face se liga à fosfocolina, uma cadeia lateral comum, encontrada em todas as membranas celulares e em muitas bactérias e protozoários. A outra face é responsável pela ligação dos neutrófilos por meio de receptores de anticorpos e do componente C1q do sistema complemento. A CRP pode, ainda, se ligar aos polissacarídeos e aos glicolipídeos bacterianos e às células, promovendo a fagocitose e a remoção de células danificadas, à beira da morte ou mortas (TIZARD, 2008; JUUL-MADSEN et al., 2008; MARSELL et al., 2005).

A CRP tem um papel importante na proteção do organismo contra infecção, limpeza de tecidos danificados, prevenção de autoimunidade e regulação da resposta inflamatória (JUUL-MADSEN et al., 2008; CHAMANZA et al., 1999). Os níveis séricos de CRP aumentam em várias vezes como uma resposta contra uma série de antígenos bacterianos e de células danificadas (JUUL-MADSEN et al., 2008).

Com base nas informações levantadas na Revisão de Literatura, foi elaborada a sequência de trabalhos a seguir, com o objetivo de avaliar os efeitos do Lipopolissacarídeo de *Salmonella Typhimurium* e da Fumonisina B₁, seja em administrações isoladas de cada um, ou em uma associação de doses de cada composto, sobre diversos parâmetros, produtivos, histológicos e bioquímicos, em frangos de corte, até o 28º dia de vida destas aves.

3. INTERFERENCE OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* LIPOPOLYSACCHARIDE ON PERFORMANCE AND BIOLOGICAL PARAMETERS OF BROILER CHICKENS

Submetido como artigo científico à Revista **Brazilian Journal of Poultry Science** (Anexo 1).

3.1. ABSTRACT

This research was conducted to determine the interference of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide (sLPS) on performance (body weight, feed consumption, and feed conversion rate), biological parameters (serum levels of total plasma proteins, albumin, total cholesterol, triglycerides, calcium, phosphorus, uric acid, and C-reactive protein, and serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyltransferase, and alkaline phosphatase), and histological evaluations of 198 day-old male broiler chickens divided into three treatments according to the dose of sLPS that was applied to the birds every other day, from 15 to 27 days of age (0, 250, or 500 µg/application/bird). At the end of the experiment (28 days), significant effects were observed in body weight ($R= -0.17$ and $P=0.05$), serum levels of total cholesterol ($R=0.43$ and $P<0.01$), phosphorus ($R=0.53$ and $P<0.01$), uric acid ($R= -0.38$ and $P<0.01$), C-reactive protein ($R=0.68$ and $P<0.01$), serum activity of aspartate aminotransferase ($R=0.39$ and $P<0.01$) and alkaline phosphatase ($R= -0.39$ and $P<0.01$). According to these results, sLPS have significant interferences in broilers, mainly on biological parameters, but also in performance.

Key-words: Lipopolysaccharide, *Salmonella* Typhimurium, broilers, C-reactive protein, performance, clinical biochemistry

3.2. INTRODUCTION

Lipopolysaccharide (LPS or Endotoxin) is the main component of Gram-negative bacterial cell wall, covering approximately 40% of bacterial surface. The specific structure of LPS differs between bacterial species. However, in a general way, they have very similar molecular structures and can be divided in: Lipid A, Inner Core, Outer Core, and O Antigen. This antigen is responsible for immunogenic responses, and also the most variable part, and can be used to differentiate the bacterial serotypes. Lipid A is a lipid portion of LPS, non variable between bacterial species (or serotypes), and is responsible for LPS's toxicity (Liebers *et al.*, 2008; Tuin, 2007). The bacterial LPS is one of the most powerful activators of the immune system, leading to a non-specific inflammatory response (Mueller *et al.*, 2004; Luyendyk *et al.*, 2002). The environment of a poultry house can be very contaminated with LPS in suspension since the contamination of the facilities with gram-negative bacteria is very common (Fernandes, 2005). Nevertheless, the presence of gram-negative bacteria in the intestinal tract and the use of anti-bacterial drugs can increase poultry exposure to LPS. Extensive researches have been conducted to determine the effects of LPS exposure in humans (Liebers *et al.*, 2008; Roth *et al.*, 1997) and mammals (Mueller *et al.*, 2004; Luyendyk *et al.*, 2002; Barton *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 1997). However, few are the researches that exploit this subject by *in vivo* procedures in broilers with different inoculation doses of LPS. The aim of this research is to provide information about the effects of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide (sLPS) in performance, biochemical parameters, and histological evaluation in broilers.

3.3. MATERIAL AND METHODS

This research was carried out using 198 day-old male Cobb broilers purchased from a local hatchery. The experiment was conducted at Instituto SAMITEC's experimental poultry farm, in Santa Maria/RS/Brazil (geographic coordinates 29°42'44" South and 53°38'25" West). The facilities consisted of a 20 m² room, under full-time air-conditioning system and exhaustion to keep the ideal environmental temperature and air quality for the birds, and a 24 hours light program from the beginning until the end of the study. Birds were kept in 18 electrically heated battery brooders, with wired floors from 1 to 28 days of age. Birds were distributed into

3 treatments with 6 replicates of 11 birds each, according to the dose of Lipopolysaccharide applied (0, 250 or 500 µg of sLPS/bird/application). The experiment was conducted with the approval and according to the recommendations of the Ethics Committee on the Use of Animals on Research of the Federal University of Rio Grande do Sul under the process number 19847.

Feed and water were provided *ad libitum*, and the feed was formulated to provide the minimum levels as follows: crude protein (20.00%), energy (3,050 kcal/g), calcium (0.95%), phosphorus available (0.48%), methionine (0.39%), methionine+cistine (0.74%), and lysine (1.19%).

The *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide (sLPS) was purchased from Sigma USA (item L7261) and diluted in sterile saline solution to reach the desired concentration and achieve the dose for each treatment. Each bird received 0.5 mL of its treatment solution every other day, starting at day 15 until the day 27 (7 applications). sLPS solution was administered to the birds using a variable volume calibrated micropipette, disposing the solution into the crop.

All birds were weighed at the beginning and at 14 days of the experiment to determine the homogeneity of the groups, and at the end of the experiment for performance evaluation. Feed consumption was also measured at 14 and 28 days of experiment. At the end of the experiment, birds were euthanized, after CO₂ desensitization, for blood and tissue collection. Blood samples (18 per treatment) were collected from the cervical veins, centrifuged and the serum was stored at -20° C until analysis. Serum samples were analyzed for total plasma proteins (TPP), albumin (ALB), total cholesterol (COL), triglycerides (TRI), calcium (Ca), phosphorus (P), uric acid (UA), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), and C-Reactive Protein (CRP). All serum analyses were done using commercial test kits (Labtest Diagnóstica S.A. - Brazil). Livers from all birds were collected for relative weight calculation. For histological evaluation, one fragment of each tissue (bursa of Fabricius, thymus, spleen, heart, liver, pancreas, small intestine, kidney, and lung) was collected from 6 birds of each treatment and processed following the usual histopathological techniques (Luna, 1968).

All data obtained in this research was submitted to a simple regression analysis. Parameters that presented significance level higher than or equal to 90% ($P \leq 0.10$) were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA), and their means

were compared by Bonferroni's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$). All statistical analyses were done in Statgraphics Centurion XV computer statistical program.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

At 1 and 14 days of experiment, there was no differences ($P > 0.05$) on body weight and feed consumption between the treatments evaluated in this experiment, indicating the homogeneity required to performance evaluations.

Birds in this experiment did not show any clinical sign of sLPS exposure, probably due to the low levels of sLPS applied. Xie *et al.*(2000) described some clinical signs in broilers receiving sLPS as 5.0 mg/kg of body weight (average 3.45 mg/bird) such as: drowsiness, lethargy, and reduced feed and water intake. Those signs began within 1 hour after application of sLPS and persisted for at least 4 hours.

Performance results of broilers at 28 days of age are presented in Table 2. Body weight showed a significant ($P = 0.05$) but low correlation ($R = -0.17$) with the doses of sLPS used in this experiment. The comparison between treatments applied to this experiment showed no differences ($P > 0.05$) in body weight, feed intake, and feed conversion rate. Guaiume (2005) had similar results in performance when injecting intraperitoneally 0, 200, or 400 µg/application/bird (applications occurred every other day, from 7 to 21 days of age) of *E. coli* LPS. However, Xie *et al.* (2000) observed a significant reduction in relative body weight gain at 12, 24, and 48 hours post injection.

Table 3 and Table 4 present the results for clinical biochemistry in the serum of broilers from each treatment. Table 3 shows the results for total cholesterol (mg/dL), phosphorus (mg/dL), and uric acid (mg/dL) levels, whilst Table 4 shows the results for aspartate aminotransferase (U/L) and alkaline phosphatase (U/L) activities and C-reactive protein (mg/L) levels. The levels of total cholesterol, phosphorus, uric acid, and C-reactive protein, and the activity of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase were significantly affected ($P \leq 0.10$) by the levels of sLPS used in this experiment.

The levels of total plasma protein, albumin, triglycerides, and calcium, and the activity of alanine aminotransferase and gamma glutamyltransferase, as well as the relative weight of liver (data not shown) were not affected ($P > 0.10$) by the levels of sLPS applied in this research.

The levels of total cholesterol ($R=0.43$) and phosphorus ($R=0.53$) showed a significant ($P<0.01$) increase with the presence of sLPS, whilst the levels of uric acid ($R= -0.38$) showed a significant ($P<0.01$) decrease. The activity of aspartate aminotransferase ($R=0.39$) also showed a significant ($P<0.01$) increase due to sLPS inoculation.

Hypercholesterolemia and hypouricemia are generally related to liver damage, hyperphosphatemia is generally associated with kidney damage, and increased activity of AST is generally associated to both liver and kidney damage (Hochleithner, 1994). According to Harr (2002), most of the synthesis of uric acid occurs in the liver, and a decrease in serum levels of this metabolite suggests liver damage. Concomitant exposure to LPS leads to reduced capability of the liver to metabolize substances that have their primary target at this organ. It is established that the co-administration of chlorpromazine, ethionine, deoxynivalenol, monocrotaline (Roth *et al.*, 1997), or aflatoxin B₁ (Roth *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 2000; Luyendyk *et al.*, 2002) with modest doses of LPS turns those substances potentially hepatotoxic at non hepatotoxic doses, suggesting that some of the systemic effects of LPS are due to its hepatic injury.

Xie *et al.* (2000) observed similar behavior of phosphorus levels in broilers receiving sLPS, and attributed this result to some transient impairment of kidney function during the acute phase of inflammatory reaction.

Few information is available regarding decreases in alkaline phosphatase (AP) activity, however increased AP activity in avian species has been associated with increased cellular activity (rather than cell damage) predominantly in the duodenum and kidney, indicating that decreased activity of this enzyme can be related to reduced cellular activity, either in the small intestine or in the kidney (Hochleithner, 1994).

The levels of C-Reactive Protein (CRP) ($R=0.68$) had a significant ($P<0.01$) increase with sLPS doses. CRP is an acute phase protein in inflammatory responses and is stimulated by the presence of both interleucine-1 (IL-1) and interleucine-6 (IL-6) (Tizard, 2008). It is associated with various inflammatory conditions as a positive acute phase protein and plays an important role in the protection against infection, clearance of damaged tissue, prevention of autoimmunity and regulation of the inflammatory responses (Chamanza *et al.*, 1999; Juul-Madsen *et al.*, 2008). After entering the cell, LPS induces, mainly, the production and secretion of IL-1, IL-6, and tumoral necrosis factor (TNF α). The main cells involved in the production and secretion of those cytokines are macrophages, neutrophils, and endothelial cells

(Fernandes, 2005; Tuin, 2007; Liebers *et al.*, 2008). The observed increase in CRP levels in this experiment does prove that LPS is one of the most powerful activators of the immune system.

At histological evaluation, no lesions were found in any tissue from birds of the control group. From birds receiving sLPS, only liver (Figure 9) and kidney (Figure 10) were affected. Microscopic alterations in kidney consisted of necrosis of tubular epithelium and were more pronounced on birds receiving 500 µg of sLPS, indicating a dose-response behavior. Alterations observed on liver were hepatocellular vacuolization, hyperplasia of biliary ducts, hepatocellular degeneration, proliferation of biliary ducts, and lymphoid hyperplasia and severity of those lesions appeared to be the same on birds receiving either 250 or 500 µg of sLPS. Barton *et al.* (2000) have proved microscopic changes in livers of rats receiving LPS.

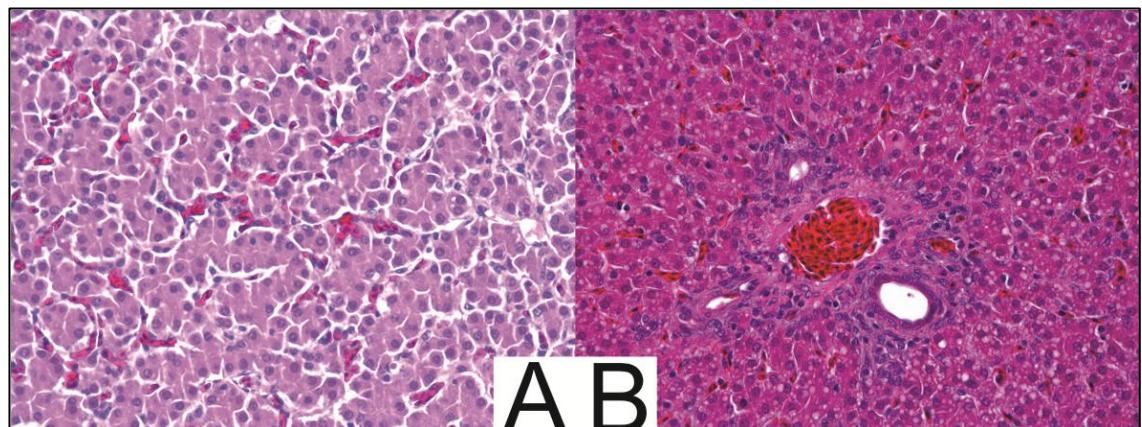


FIGURE 9 - Microscopic aspect of liver from broilers receiving no LPS (A) and 500 µg of sLPS (B).

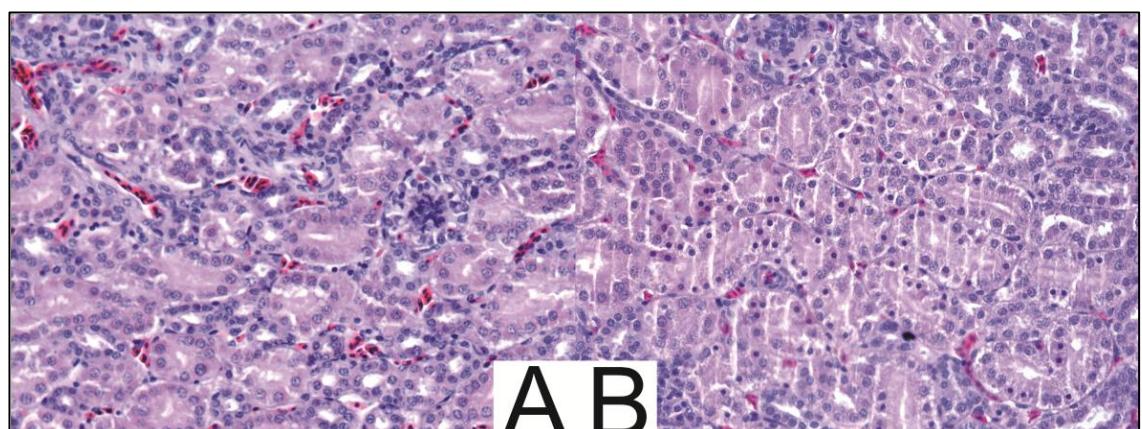


FIGURE 10 - Microscopic aspect of kidneys from broilers receiving no LPS (A) and 500 µg of sLPS (B).

3.5. CONCLUSIONS

The results obtained on this research show the impact of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide on broilers. Despite the fact of not presenting differences between treatments, the presence of sLPS showed a significant negative correlation in body weight at 28 days of age. Nevertheless, clinical biochemistry and inflammatory parameters were also affected by the presence of sLPS, demonstrating the biological effect of this substance. As LPS is widely distributed in poultry houses, some losses can be occurring in broiler production that are not being assessed at this point due to a lack on the understanding of LPS impacts on broilers.

3.6. REFERENCES

- Barton CC, Hill DA, Yee SB, Barton EX, Ganey PE, Roth RA. Bacterial lipopolysaccharide exposure augments aflatoxin B1-induced liver injury. *Toxicological Sciences*. 2000; 55:444-452.
- Chamanza R, Veen L, Tivapasi MT, Toussaint MJM. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World's Poultry Science Journal*. 1999; 55:61-71.
- Fernandes FC. Endotoxinas em aviários. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho*. 2005; 3(1):22-28.
- Gauiume EA. Effects of continuous administration of low-dose of Escherichia coli lipopolysaccharide in chicks and poult fed non toxic doses of aflatoxin B1 and T-2 toxin. [Tesis]. University of Missouri, Columbia, United States of America. 2005. 200 p.
- Harr KE. Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Veterinary Clinical Pathology*. 2002; 31(3):140-151.
- Hochleithner M. Biochemistries. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, editor. *Avian medicine and surgery: principles and applications*. Lake Worth: Wingers Publishing Inc; 1994. p.223-245.
- Juul-Madsen HR, Viertlboeck B, Smith AL, Göbel TWF. Avian innate immune responses. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA, editor. *Avian Immunology*. San Diego: Elsevier; 2008. p.129-158.
- Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Health effects due to endotoxin inhalation (review). *Arch. Toxicol.* 2008; 82:203-210.
- Luna GC. Manual of histologic staining methods of the armed forces. 3 ed. New York: Mc Graw-Hill; 1968.

Luyendyk JP, Shores KC, Ganey PE, Roth RA. Bacterial lipopolysaccharide exposure alters aflatoxin B1 hepatotoxicity: Benchmark dose analysis for markers of liver injury. *Toxicological Sciences*. 2002; 68:220-225.

Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, Fukase K, Schromm AB, SEYDEL U. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279:26307-26313.

Roth RA, Harkema JR, Pestka JP, Ganey PE. Is exposure to Bacterial Endotoxin a Determinant of Susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997; 147:300-311.

Tizard IR. *Imunologia Veterinária*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Tuin A. Detoxification of LPS by alkaline phosphatase: application of a new concept in sepsis and inflammatory bowel disease. [Tesis]. University of Groningen, Groningen, Netherlands. 2007. 192 p.

Xie H, Rath NC, Huff WE, Balog JM. Effects of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poultry Science*. 2000; 79:33-40.

TABLE 2 - Performance of male broiler chicks receiving *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide, every other day, from 15 to 27 days of age.

SLPS¹	BW²	(CV)³	FC⁴	(CV)	FCR⁵	(CV)
0	1450.1 ^a	(7.5)	2375.8 ^a	(3.1)	1.64 ^a	(3.4)
250	1422.0 ^a	(9.4)	2379.5 ^a	(2.2)	1.67 ^a	(2.7)
500	1395.7 ^a	(10.7)	2326.3 ^a	(3.4)	1.66 ^a	(1.9)
P	0,14			0.37		0.57

Correlation Matrix

Model	BW=1449.8-0.109*LPS	NS⁶	NS
R	-0.17		
P	0.05	0.23	0.49

^a Averages in column with the same superscript do not differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ SLPS= Dose of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² Body Weight (g).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Cumulative Feed consumption (g/bird).

⁵ Feed Conversion Rate (g/g).

⁶ Not significant on simple regression analysis (P>0.10).

TABLE 3 - Serum levels of total cholesterol, phosphorus, and uric acid of male broiler chicks receiving *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide, every other day, from 15 to 27 days of age.

SLPS ¹	COL ²	(CV) ³	P ⁴	(CV)	UA ⁵	(CV)
0	115.25 ^b	(12.7)	11.59 ^b	(15.7)	7.33 ^a	(27.2)
250	123.91 ^{ab}	(17.8)	13.40 ^a	(12.2)	6.92 ^{ab}	(14.4)
500	136.38 ^a	(13.1)	14.52 ^a	(16.6)	5.88 ^b	(19.0)
P	0.01			<0.01		0.03
Correlation Matrix						
Model	COL=114.66+0.042*LPS		P=11.70+0.006*LPS		UA=7.43-0.003*LPS	
R	0.43		0.53		-0.38	
P	<0.01		<0.01		<0.01	

^{a-b} Averages in column with different superscripts differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ SLPS= Dose of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² Mean cholesterol levels in the serum (mg/dL).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean phosphorus levels in the serum (mg/dL).

⁵ Mean uric acid levels in the serum (mg/dL).

TABLE 4 - Serum levels of aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, and C-reactive protein of male broiler chicks receiving *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide, every other day, from 15 to 27 days of age.

sLPS ¹	AST ²	(CV) ³	AP ⁴	(CV)	CRP ⁵	(CV)
0	248.92 ^b	(15.7)	2756.58 ^a	(22.7)	144.0 ^b	(35.6)
250	297.80 ^a	(11.7)	2066.17 ^{ab}	(44.9)	163.2 ^b	(28.4)
500	294.79 ^a	(17.9)	1872.00 ^b	(47.5)	312.0 ^a	(31.4)
P	<0.01		0.02		<0.01	
Correlation Matrix						
Model	AST=257.7+0.091*LPS		AP=2659-1.735*LPS		CRP=119.1+0.34*LPS	
R	0.39			-0.39		0.68
P	<0.01			<0.01		<0.01

^{a - b} Averages in column with different superscripts differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ sLPS= Dose of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² Mean aspartate aminotransferase activity in the serum (U/L).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean alkaline phosphatase activity in the serum (U/L).

⁵ Mean C-reactive protein levels in the serum (mg/L).

4. EFFECTS OF FUMONISIN B₁ ON SELECTED PATHOLOGICAL RESPONSES AND PERFORMANCE OF BROILER CHICKENS

Submetido como artigo científico à revista **Avian Pathology** (Anexo 2).

4.1. ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effects of three doses of fumonisin B₁ (FB) on biological variables (relative weight of liver [RWL], total plasma protein [TPP], albumin [Alb], calcium [Ca], phosphorus [Ph], uric acid [UA], alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST], gamma glutamyltransferase [GGT], alkaline phosphatase [AP], total cholesterol [Chol], triglycerides [Tri], sphinganine-to-sphingosine ratio [SA:SO], and C-reactive protein [CRP]), morphological evaluation of the small intestine (villous height [VH], crypt depth [CD], and villous-to-crypt ratio [V:C]), histological evaluation of several tissues, and on performance (body weight [BW], feed intake [FI], and feed conversion rate [FCR]) of broiler chickens. Biological variables and performance were evaluated at 14 and 28 days of experiment, whilst morphological and histological evaluations were performed only at day 28. Significant effects of FB were observed on BW, FI, RWL, TPP, Ca, UA, ALT, AST, GGT, Chol, and Tri at both 14 and 28 days evaluations and on FCR, Alb, and Ph only at the 28 days evaluation. FB also determined effects on SA:SO, CRP, VH, and V:C, at 28 days. No effect was observed on AP. Significant histological lesions were observed on liver and kidney of FB inoculated broilers. Those results show that FB has a significant effect on biological, morphological, and histological variables and on performance of broiler chickens.

Key Words: fumonisin, broiler, performance, biochemical analysis, intestinal morphology, C-reactive protein, sphinganine, sphingosine.

4.2. INTRODUCTION

Fumonisins are secondary metabolites of *Fusarium verticilloides* and were first isolated and chemically characterized in 1988 (Gelderblom et al., 1988). The main FB prevalence in Brazilian corn is 62% (out of 13,756 samples) under an average 1.2 mg/kg contamination on the last 11 years (Mallmann et al., 2010). The chemical structure of FB is similar to that of the sphingoid bases (sphinganine and sphingosine) and the main mechanism of action proposed is that FB inhibits the ceramide synthase enzyme, blocking the sphingoid turnover. So, the sphinganine-to-sphingosine ratio (SA:SO) is the most sensitive biomarker to FB intoxication in many animal species (Voss et al., 2007). Two important animal diseases/syndromes are currently associated to Fumonisin B₁ (FB) contamination in feed: the equine leukoencephalomalacia (Marasas et al., 1988) and the porcine pulmonary edema (Harrison et al., 1990). Some researches point out that FB is involved in some cases of human cancer, such as esophageal (Dragan et al., 2001) and liver (Ueno et al., 1997) cancers. It is well known that FB causes losses when contaminated feed is provided to broilers (Kubena et al., 1997; Li et al., 1999; Henry et al., 2000; Broomhead et al., 2002; Del Bianchi et al., 2005), however, there is no consensus on which variables FB impacts. The objective of this research was to evaluate the clinical response of broiler chickens receiving 3 different doses of Fumonisin B₁ in the diet, from 1 to 28 days of age. Clinical variables evaluated included performance, serum biochemistry, acute phase protein levels, sphinganine-to-sphingosine ratio, histopathological changes, and morphologic evaluation of small intestine.

4.3. MATERIAL AND METHODS

4.3.1. Experimental animals and protocol

One hundred and ninety-eight one-day-old Cobb commercial male broiler chickens were divided into 3 treatments with 6 replicates each, with 11 birds in each replicate. Birds were kept in 18 electrically heated, wired floor cages, from day 1 to 28. Temperature and humidity were controlled via air-conditioners and exhausters and a 24-hour light program was applied throughout the entire experiment. The protocol applied to this experiment, including sample collection methods, was reviewed and

approved by the Ethics Committee on the Use of Animals on Research of the Federal University of Rio Grande do Sul under the process number 19847.

4.3.2. Experimental diets

A corn-, soybean meal-based basal diet was formulated to meet the standard nutritional requirements of broilers in initial phase (NRC, 1994). Birds received experimental diets from day 1 to 28, and feed was provided *ad libitum*. To reach the desired FB contamination in the feed (0, 100, or 200 mg/kg of feed), a *Fusarium verticilloides* culture material (FCM) containing 5,715 mg of FB₁/kg was incorporated to the feed. This FCM was obtained according to a procedure previously described by Dilkin et al. (2002). The diet also contained a certain amount of Fumonisins B₂ (0, 20, and 40 mg/kg of each feed), considered to be a less toxic metabolite of *F. verticilloides* (Kubena et al., 1995). Before the beginning of the experiment, the basal diet was screened for the presence of mycotoxins (aflatoxins [B₁, B₂, G₁ and G₂], fumonisins [B₁ and B₂], zearalenone, ciclopiazonic acid, and trichothecenes [deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, nivalenol, fusarenone-X, T-2 toxin, and HT-2 toxin]). All results were below the detection limits (aflatoxins = 1 µg/kg each; fumonisins = 125 µg/kg each; zearalenone = 20 µg/kg; ciclopiazonic acid = 5 µg/kg; trichothecenes = 100 µg/kg each) of the methods applied.

4.3.3. Performance evaluation

At the beginning of the experiment, all birds were individually weighed to determine the homogeneity of the groups. The average body weight was 46.94 g and there were no differences between groups ($P = 0.69$). At 14 and 28 days of experiment birds were individually weighed for performance evaluation. At the same check-points feed intake and feed conversion rate were calculated to each replicate. Birds were inspected twice a day for clinical signs of FB intoxication and mortality.

4.3.4. Sample collection

At 14 days of experiment, 18 broilers from each treatment (3 per replicate) were euthanized by cervical dislocation after carbon dioxide desensitization

for blood collection, and relative weight of liver calculation. The same procedure was used at 28 days of experiment. In addition, organ samples were collected for histopathological evaluation (thymus, bursa of Fabricius, spleen, heart, liver, pancreas, intestine, kidney, and lung). The number of samples taken from each treatment was: blood = 18 samples; organs = 6 samples; and liver for relative weight calculation = from all birds (48 samples). Blood samples were centrifuged 30 min after collection and serum was stored at -20° C for further analysis. Organ samples were collected in 10% neutral buffered formalin for histopathological evaluation and processed for hematoxylin and eosin staining (Luna, 1968). Additionally, at 28 days of experiment, 54 samples (18 per treatment) of small intestine (jejunum) were collected for morphologic evaluation. Samples were collected and processed using the same procedure applied for samples to histopathological evaluation. After stained, measurements of villous height and crypt depth were taken using the Motic Image Plus 2.0 software (Motic China Group Co. LTD. 2007) according to procedure previously described (Thompson and Applegate, 2006).

4.3.5. Serum sample analysis

Serum samples were analyzed for total plasma proteins (TPP), albumin (Alb), total cholesterol (Chol), triglycerides (Tri), calcium (Ca), phosphorus (Ph), uric acid (UA), and C-reactive protein (CRP) levels, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), and alkaline phosphatase (AP) activity, using commercial kits (Labtest Diagnostica, SA, Vista Alegre, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) in a spectrophotometer. Additionally, free sphinganine and sphingosine levels in serum were analyzed by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Lieser et al., 2003) for sphinganine-to-sphingosine ratio (SA:SO) calculation.

4.3.6. Statistical analysis

All data obtained in this experiment were submitted to linear simple regression analysis according to the levels of FB applied. Variables that showed a significance level equal to or higher than 90% ($P \leq 0.10$) in this procedure were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA) and means were compared by

Bonferroni's multiple range test ($P \leq 0.05$). Analyses were done in Statgraphics Centurion computer statistical software (Statgraphics Centurion 15.2.14, Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA).

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1. Performance

All performance results measured in this experiment were significantly affected (Table 5) by the presence of FB in broilers feed. Both body weight (BW) and feed intake (FI) were reduced ($P < 0.01$) as the inclusion of FB was increased. The reduction on BW and FI in broilers receiving FB was observed at 14 and 28 days of experiment. Feed conversion rate (FCR) was also affected by the presence of FB in the feed. However, a significant effect was only observed at 28 days of experiment ($P = 0.02$), and FCR values were increased in birds receiving FB contaminated feed.

Similar results have been previously described in broilers receiving FB in doses ranging from 10 to 400 mg/kg of feed (Ledoux et al., 1992; Kubena et al., 1997) and the effects were observed after 14 days of exposure. FCR is directly affected by changes in BW and FI. In this research, the reduction on BW gain in broilers receiving FB contaminated feed was more severe than the reduction on FI, resulting in increased values of FCR. The reduction on BW can be partially explained by the reduced FI, but it can also be due to changes in intestinal morphology (reducing nutrients digestibility) and to the effect of FB on liver metabolism (Kubena et al., 1997; Voss et al., 2007).

4.4.2. Serum analyses

Results from serum analyses are presented in Tables 6 to 9. Serum levels of TPP, Ca, Chol, and Tri, and serum activity of ALT, AST, and GGT were increased in broilers receiving FB contaminated feed at both 14 and 28 days evaluation. Serum levels of Alb, Ph, and CRP and the SA:SO ratio were increased by the presence of FB in broilers feed only at 28 days of experiment. Serum levels of UA were increased at 14 days of experiment and reduced at the 28 days evaluation. No significant effect ($P > 0.10$) of FB was observed in AP activity in the serum.

Increased levels of Chol and Tri and increased activity of AST and GGT are generally associated with liver damage (Harr, 2002; Lumeij, 2008), and were

observed in this experiment. Increased levels of UA and Ph indicate kidney lesions whilst reduced UA levels are usually observed in liver damage cases (Hochleithner, 1994). According to Voss et al. (2007), FB main target organs are liver and kidney. Ledoux et al. (1992) and Kubena et al. (1997) described similar results for AST and Chol levels in FB poisoned broilers.

Protein (TPP and Alb) levels in broilers receiving hepatotoxic substances are generally decreased (Hochleithner, 1994). However, some *in vitro* investigation on the effect of FB on endothelial cells from porcine pulmonary artery indicated that this mycotoxin induces an increased permeability on the endothelium for Alb and other proteins (Ramasamy et al., 1995). In addition, *in vivo* studies have demonstrated this effect on TPP and Alb levels in the serum of broilers receiving FB contaminated feed (Kubena et al., 1997). Increased levels of Ca are generally associated with hyperalbuminemia (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008). The enzyme ALT is distributed between several tissues in broilers and has poor diagnostic value. Generally, increased ALT activity in serum indicates nonspecific cell damage (Hochleithner, 1994).

Due to its structural similarity to the sphingoid bases sphinganine (SA) and sphingosine (SO), FB competitively inhibits the enzyme ceramide synthase, and as an immediate result, occurs an accumulation of the enzyme's substrates SA and, to a lower degree, SO in tissues, serum, and urine (Voss et al., 2007). The biological response for this mechanism is an increase in SA:SO. Similar effects on SA:SO to those observed in this experiment have been previously reported in several species, including broilers (Henry et al., 2000; Broomhead et al., 2002; Tran et al., 2003).

Regarding to CRP, its major function is to bind to foreign pathogens and damaged host cells to initiate their elimination. It is an important acute phase protein and its serum levels increase in response to a variety of bacteria and intracellular antigens of damaged cells (Chamanza et al., 1999; Juul-Madsen et al., 2008). An indirect consequence of ceramide synthase enzyme inhibition by FB is to stimulate either mitosis or apoptosis (Dragan et al., 2001; Voss et al., 2007) leading to a condition where an inflammatory response is required.

4.4.3. Pathological findings

The relative weight of liver (RWL) was significantly increased in broilers receiving FB contaminated feed in both evaluations (14 and 28 days). Evaluation on

morphologic changes in the small intestine revealed a significant reduction on villous height (VH) and villous-to-crypt ratio (V:C), but no changes in crypt depth (CD) in broilers receiving FB. Histopathological lesions were found only in liver (Figure 11) and kidney (Figure 12) (no significant lesions were found in heart, lungs, thymus, bursa of Fabricius, spleen, and pancreas). In the liver, the main alterations observed were hyperplasia of biliary ducts, hepatocellular degeneration, proliferation of biliary ducts, and lymphoid hyperplasia, whilst in kidney the only lesion observed was a necrosis on the tubular epithelium. Lesions in the liver appear to be the same, regardless the dose of FB used, whilst the lesions on kidney appear to be more severe in those birds that received the highest dose of FB.

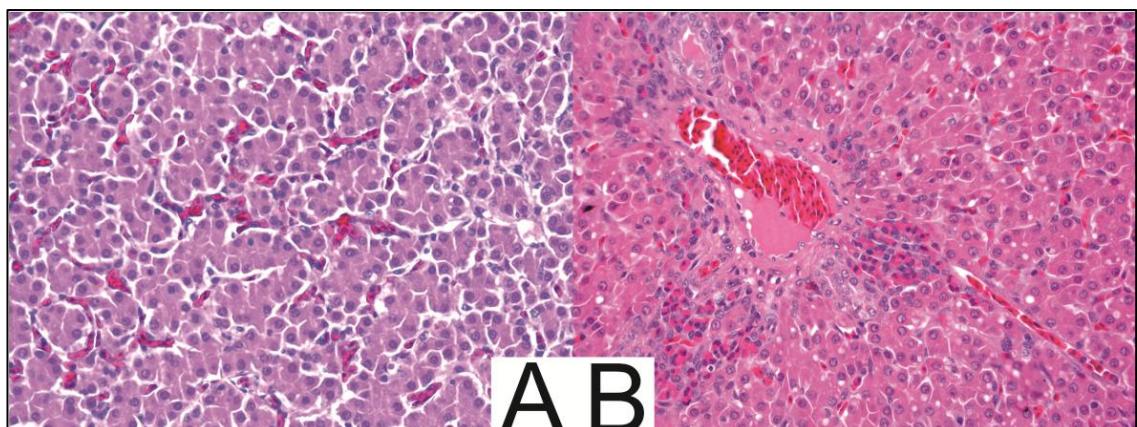


FIGURE 11 - Microscopic aspect of liver from broilers receiving 0 mg/kg (A) or 200 mg/kg (B) of FB.

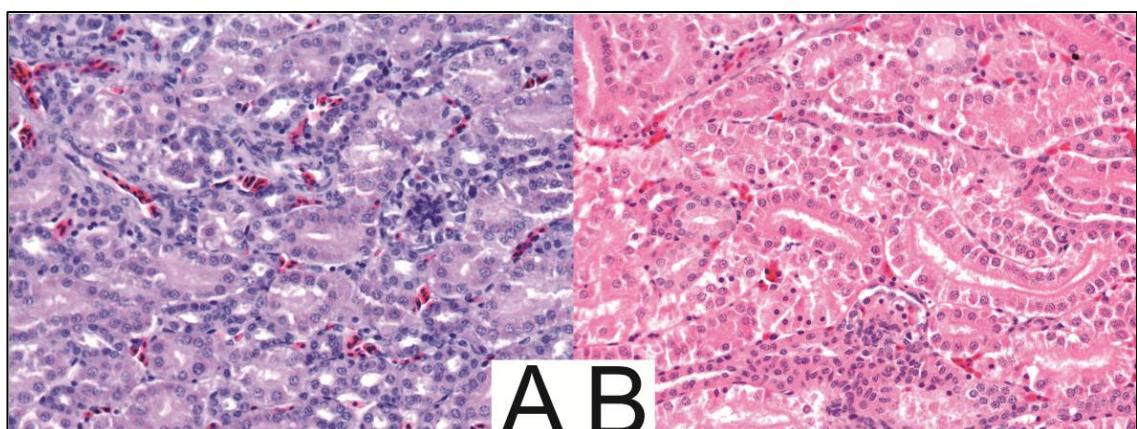


FIGURE 12 - Microscopic aspect of kidneys from broilers receiving 0 mg/kg (A) or 200 mg/kg (B) of FB

Significant amounts of FB are found mainly in the gastrointestinal tract, liver, and kidney and the lesions on those tissues express most of the clinical and pathological effects of FB intoxication (Ueno et al., 1997; Dragan et al., 2001; Voss et

al., 2007). The effects observed in this study on RWL and histological changes in liver and kidney show that those are the main target organs of FB in broilers and have been previously described in broilers (Ledoux et al., 1992; Kubena et al., 1997; Henry et al., 2000; Del Bianchi et al., 2005), turkeys (Kubena et al., 1995), and in pigs (Harrison et al., 1990). In the small intestine, crypts are responsible by the turnover of villous cell, and villous are responsible by nutrient absorption. High villi mean larger absorption surface, and flat crypts mean normal cell turnover on villi. Both are desirable, and this relation is expressed by high V:C (Gao et al., 2008). FB causing reduction on VH have been previously described in pigs both *in vitro* in intestinal epithelial cells (Bouhet et al., 2004) and *in vivo* (Dilkin et al., 2004).

4.5. CONCLUSIONS

According to the results obtained in this experiment, FB is an important mycotoxin in broiler production, having its effects on several clinical and pathological variables. The main target organs are liver and kidneys, but the small intestine is also affected, leading to some performance losses, mainly on feed conversion rate. In these experimental conditions, FB represents negative effects at a dose of 100 mg/kg of feed at the early 14 days of intoxication.

4.6. REFERENCES

- Bouhet, S., E. Hourcade, N. Loiseau, A. Fikry, S. Martinez, M. Roselli, P. Galtier, E. Mengheri, and I. P. Oswald. The mycotoxin fumonisin B1 alters the preproliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 77:165-171. 2004.
- Broomhead, J. N., D. R. Ledoux, A. J. Bermudez, and G. E. Rottinghaus. Chronic effects of Fumonisin B1 in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poult. Sci.* 81:56-61. 2002.
- Chamanza, R., L. Veen, M. T. Tivapasi, and M. J. M. Toussaint. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World's Poult. Sci. J.* 55:61-71. 1999.
- Del Bianchi, M., C. A. F. Oliveira, R. Albuquerque, J. L. Guerra, and B. Correa. Effects of prolonged oral administration of Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ in broiler chickens. *Poult. Sci.* 84:1835-1840. 2005.
- Dilkin, P., R. Hassegawa, T. A. Reis, C. A. Mallmann, and B. Corrêa. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. *Ciência Rural*. 34:175-181. 2004.

- Dilkin, P., C. A. Mallmann, C. A. A. Almeida, E. B. Stefanon, F. Z. Fontana, and E. L. Milbradt. Production of fumonisins by strains of *Fusarium verticilloides* according to temperature, moisture and growth period. Brazilian Journal of Microbiology. 33:111-118. 2002.
- Dragan, Y. P., W. R. Bidlack, S. M. Cohen, T. L. Goldsworthy, G. C. Hard, P. C. Howard, R. T. Riley, and K. A. Voss. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: Fumonisin B1 as an example. Toxicol. Sci. 61:6-17. 2001.
- Gao, J., H. J. Zhang, S. H. Yu, S. G. Wu, I. Yoon, J. Quigley, Y. P. Gao, and G. H. Qi. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. Poult. Sci. 87:1377-1384. 2008.
- Gelderblom, W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J Kriek. Fumonisins – Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium verticilloides*. App. Environ. Microbiol. 54:1806-1811. 1988.
- Harr, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. Vet. Clin. Pathol. 31:140-151. 2002.
- Harrison, L. R., B. M. Colvin, J. T. Greene, L. E. Newman, and J. R. Cole Jr. Pulmonary edema and hydrotorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium verticilloides*. J. Vet. Diagn. Invest. 2:217-221. 1990.
- Henry, M. H., R. D. Wyatt, and O. J. Fletcher. The toxicity of purified Fumonisin B₁ in broiler chicks. Poult. Sci. 79:1378-1384. 2000.
- Hochleithner, M. Biochemistries. Pages 223-245 in Avian medicine and surgery: principles and applications. Ritchie B. W., G. J. Harrison, and L. R. Harrison. Wingers Publishing Inc, Lake Worth. 1994.
- Juul-Madsen, H. R., B. Viertlboeck, A. L. Smith, and T. W. F. Göbel. Avian innate immune responses. Pages 129-158 in Avian Immunology. F. Davison, B. Kaspers, K. A. Schat. Elsevier, San Diego, CA. 2008.
- Kubena, L. F., T. S. Edrington, R. B. Harvey, S. A. Buckley, T. D. Phillips, G. E. Rottinghaus, and H. H. Casper. Individual and combined effects of Fumonisin B1 present in *Fusarium verticilloides* culture material and T-2 toxin or Deoxynivalenol in broiler chicks. Poult. Sci. 76:1239-1247. 1997.
- Kubena, L. F., T. S. Edrington, C. Kamps-Holtzapple, R. B. Harvey, M. H. Elissalde, and G. E. Rottinghaus. Effects of feeding Fumonisin B₁ present in *Fusarium verticilloides* culture material and Aflatoxin singly and in combination to turkey poultts. Poult. Sci. 74:1295-1303. 1995.
- Ledoux, D. R., T. P. Brown, T. S. Weibking, and G. E. Rottinghaus. Fumonisin toxicity in broiler chicks. J. Vet. Diagn. Invest. 4:330-333. 1992.

- Li Y. C., D. R. Ledoux, A. J. Bermudez, K. L. Fritsche, and G. E. Rotinghaus. Effects of Fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78:1275-1282. 1999.
- Lieser, B., G. Liebisch, W. Drobnik, and G. Schmitz. Quantification of sphinganine and sphingosine from crude extracts by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research.* 44:2209-2216. 2003.
- Lumeij, J. T. Avian Clinical Biochemistry. Pages 839-872 in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Kaneko, J. J., J. W. Harvey, and M. L. Bruss. 6th Ed. Elsevier, San Diego, CA. 2008.
- Luna, G. C. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, NY. 1968.
- Mallmann, C. A., P. Dilkin, R. H. Rauber, and L. Z. Giacomini. Mycotoxicosis in swine. Pages 67-95 in *Mycotoxicoses in animals economically important*. E. Gonçalvez, J. D. Felicio, and S. Aquino, Ed. Nova Science Publishers, Inc, New York, NY. 2010.
- Marasas, W. F., T. S. Kellerman, W. C. Gelderblom, J. A. Coetzer, P. G. Thiel, and J. J. Van der Lugt. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium verticilloides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 55:197-203. 1988.
- NRC. Nutrient Requirement of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 1994.
- Ramasamy, S., E. Wang, B. Henning, and A. H. Merril Jr. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133:343-348. 1995.
- Thompson, K. L. and T. J. Applegate. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poult. Sci.* 85:1535-1540. 2006.
- Tran, S. T., J. D. Bailly, D. Tardieu, S. Duran, G. Bernard, and P. Guerre. Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks. *Chem. Biol. Interac.* 146:61-72. 2003.
- Ueno, Y., K. Iijima, S. D. Wang, Y. Sugiura, M. Sekijima, T. Tanaka, C. Chen, and S. Z. Yu. Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem. Toxicol.* 35:1143-1150. 1997.
- Voss, K. A., g. w. Smith, and w. m. Haschek. Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action ant toxicity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:299-325. 2007.

TABLE 5 - Performance of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B₁ contaminated feed during 28 days.

FB ¹	Body Weight ² (CV ³)		Feed Intake ⁴ (CV)		Feed Conversion Rate ⁵ (CV)	
	14 days	28 days	14 days	28 days	14 days	28 days
0	523.49 ^a (8.8)	1450.08 ^a (7.5)	645.90 ^a (2.8)	2375.77 ^a (3.1)	1.23 ^a (2.5)	1.64 ^b (3.4)
100	452.58 ^b (15.4)	1225.59 ^b (11.7)	586.40 ^b (7.8)	2205.50 ^b (3.7)	1.30 ^a (4.6)	1.81 ^a (4.9)
200	420.73 ^c (14.4)	1189.59 ^b (14.5)	532.62 ^c (3.7)	2137.50 ^b (4.2)	1.27 ^a (1.7)	1.77 ^a (2.2)
P _{anova}	0.00	0.00	<0.01	<0.01	0.06	<0.01
Correlation Matrix						
Model	Y=517.01-0.515*X	Y=1418.67-1.302*X	Y=644.95-0.566*X	Y=2358.72-1.191*X	NS ⁶	Y=1.68+0.001*X
R	-0.57	-0.58	-0.85	-0.78		0.55
P	0.00	0.00	0.00	<0.01	0.21	0.02

^{a-c} Averages with different superscripts within the same column differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg).

² Mean body weight (g).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean feed intake (g/bird).

⁵ Mean feed conversion rate (g/g).

⁶ Not significant on simple regression analysis (P>0.10).

TABLE 6 - Relative weight of liver, serum levels of total plasma proteins and albumin of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B₁ contaminated feed during 28 days.

FB ¹	Relative Weight of Liver ² (CV ³)		Total Plasma Proteins ⁴ (CV)		Albumin ⁵ (CV)	
	14 days	28 days	14 days	28 days	14 days	28 days
0	3.74 ^c (12.0)	2.68 ^c (10.0)	2.69 ^b (19.4)	3.89 ^b (12.0)	1.40 ^a (19.1)	1.43 ^c (16.5)
100	4.84 ^b (16.0)	3.30 ^b (17.7)	3.17 ^a (16.3)	4.13 ^{ab} (15.9)	1.53 ^a (14.6)	1.76 ^b (12.5)
200	5.51 ^a (12.0)	3.89 ^a (21.2)	3.32 ^a (11.9)	4.68 ^a (18.8)	1.52 ^a (15.2)	2.13 ^a (18.7)
P _{anova}	0.00	0.00	<0.01	<0.01	0.25	0.00
Correlation Matrix						
Model	Y=3.81+0.009*X	Y=2.68+0.006*X	Y=2.74+0.003*X	Y=3.84+0.004*X	NS ⁶	Y=1.42+0.004*X
R	0.75	0.62	0.48	0.44		0.72
P	0.00	0.00	<0.01	<0.01	0.16	0.00

^{a-c} Averages with different superscripts within the same column differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg).

² Mean relative weight of liver (g/100g of body weight).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean serum levels of total plasma protein (g/dL).

⁵ Mean serum levels of albumin (g/dL).

⁶ Not significant on simple regression analysis (P>0.10).

TABLE 7 - Serum levels of calcium, phosphorus, and uric acid of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B₁ contaminated feed during 28 days.

FB ¹	Calcium ² (CV ³)		Phosphorus ⁴ (CV)		Uric Acid ⁵ (CV)	
	14 days	28 days	14 days	28 days	14 days	28 days
0	9.84 ^b (15.6)	9.19 ^b (14.6)	13.02 ^a (18.3)	11.59 ^a (15.7)	11.94 ^b (17.7)	7.33 ^a (27.2)
100	9.81 ^b (8.3)	9.92 ^b (13.1)	12.72 ^a (17.1)	12.42 ^a (14.4)	13.25 ^{ab} (19.0)	6.89 ^a (20.0)
200	11.56 ^a (11.2)	11.41 ^a (8.9)	14.23 ^a (16.1)	13.07 ^a (5.6)	14.77 ^a (17.5)	5.99 ^a (18.9)
P _{anova}	<0.01	0.00	0.16	0.07	<0.01	0.06
Correlation Matrix						
Model	Y=9.55+0.008*X	Y=9.07+0.011*X	NS ⁶	Y=11.62+0.007*X	Y=11.91+0.014*X	Y=7.40-0.007*X
R	0.47	0.60		0.36	0.45	-0.34
P	<0.01	0.00	0.15	0.02	<0.01	0.02

^{a-b} Averages with different superscripts within the same column differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg).

² Mean serum levels of calcium (mg/dL).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean serum levels of phosphorus (mg/dL).

⁵ Mean serum levels of uric acid (mg/dL).

⁶ Not significant on simple regression analysis (P>0.10).

TABLE 8 - Serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and gamma glutamyltransferase of male broiler chickens, at 14 and 28 days of age, fed fumonisin B₁ contaminated feed during 28 days.

FB ¹	Alanine Aminotransferase ² (CV ³)		Aspartate Aminotransferase ⁴ (CV)		Gamma Glutamyltransferase ⁵ (CV)	
	14 days	28 days	14 days	28 days	14 days	28 days
0	11.43 ^c (27.2)	14.00 ^b (32.2)	314.72 ^b (18.7)	248.92 ^b (15.7)	19.03 ^b (30.2)	28.35 ^b (15.0)
100	14.94 ^b (21.4)	18.56 ^b (40.4)	521.65 ^a (11.9)	304.85 ^a (17.0)	21.89 ^b (20.4)	40.80 ^a (21.1)
200	18.57 ^a (11.0)	25.69 ^a (44.1)	560.89 ^a (33.4)	319.99 ^a (21.0)	28.38 ^a (18.5)	35.56 ^a (25.7)
P _{anova}	0.00	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Correlation Matrix						
Model	Y=11.41+0.036*X	Y=13.55+0.059*X	Y=357.72+1.123*X	Y=256.10+0.353*X	Y=18.58+0.046*X	Y=31.26+0.037*X
R	0.69	0.51	0.55	0.47	0.60	0.33
P	0.00	<0.01	<0.01	<0.01	0.00	0.02

^{a-c} Averages with different superscripts within the same column differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ FB=Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg).

² Mean serum activity of alanine aminotransferase (U/L).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean serum activity of aspartate aminotransferase (U/L).

⁵ Mean serum activity of gamma glutamyltransferase (U/L).

TABLE 9 - Serum levels of total cholesterol and triglycerides, at 14 and 28 days, serum sphinganine-to-sphingosine ratio and serum levels of C-reactive protein at 28 days of age, of male broiler chickens fed fumonisin B₁ contaminated feed during 28 days.

FB ¹	Total Cholesterol ² (CV ³)		Triglycerides ⁴ (CV)		SA:SO ⁵ (CV)	CRP ⁶ (CV)
	14 days	28 days	14 days	28 days		
0	150.37 ^c (12.6)	115.25 ^c (12.7)	104.41 ^b (29.4)	61.01 ^b (31.9)	0.47 ^b (41.6)	144.00 ^a (35.6)
100	173.69 ^b (15.5)	172.19 ^b (15.9)	135.32 ^a (23.0)	90.04 ^a (26.6)	1.59 ^a (16.8)	218.67 ^a (61.2)
200	211.41 ^a (16.8)	214.01 ^a (14.4)	157.93 ^a (18.6)	84.99 ^a (21.2)	1.75 ^a (15.7)	245.33 ^a (44.2)
P _{anova}	0.00	0.00	<0.01	<0.01	0.00	0.15
Correlation Matrix						
Model	Y=148.25+0.302*X	Y=117.36+0.496*X	Y=105.94+0.267*X	Y=66.39+0.122*X	Y=0.61+0.007*X	Y=152.82+0.502*X
R	0.68	0.86	0.59	0.42	0.86	0.38
P	0.00	0.00	0.00	<0.01	0.00	0.06

^{a-c} Averages with different superscripts within the same column differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg).

² Mean serum levels of total cholesterol (mg/dL).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean serum levels of triglycerides (mg/dL).

⁵ Mean serum sphinganine-to-sphingosine ratio.

⁶ Mean serum levels of C-reactive protein (mg/L)

TABLE 10 - Measurements of villous height, crypt depth, and villous-to-crypt ratio at 28 days of age, of male broiler chickens fed fumonisin B₁ contaminated feed during 28 days.

FB ¹	VH ² (CV ³)	CD ⁴ (CV)	V:C ⁵ (CV)
0	1.40 ^a (13.1)	0.13 ^a (22.0)	10.89 ^a (19.5)
100	1.24 ^{ab} (17.4)	0.13 ^a (12.8)	9.27 ^{ab} (14.2)
200	1.18 ^b (6.4)	0.13 ^a (15.5)	9.16 ^b (12.1)
P _{anova}	<0.01	0.82	0.03
Correlation Matrix			
Model	Y=1.3860-0.0011*X	NS ⁶	Y=10.673-0.0088*X
R	-0.50		-0.42
P	<0.01	0.67	0.01

^{a-b} Averages with different superscripts within the same column differ under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg).

² Mean villous height (mm).

³ Coefficient of variation (%).

⁴ Mean crypt depth (mm).

⁵ Mean villous-to-crypt ratio.

⁶ Not significant on simple regression analysis (P>0.10).

5. INDIVIDUAL AND COMBINED EFFECTS OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM LIPOPOLYSACCHARIDE AND FUMONISIN B₁ IN BROILER CHICKENS

Submetido e aceito como artigo científico na revista **Poultry Science** (Anexo 3 e Anexo 4).

5.1. ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the individual and combined effects of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide (**sLPS**) and fumonisin B₁ (**FB**) on performance, relative weight of liver, biological parameters, and histological evaluation of several tissues from 432 day-old male broiler chickens divided into nine treatments according to the dose of FB (0, 100, or 200 mg/kg, from day 1 to day 28) and sLPS (0, 250, or 500 µg/application/bird, every other day, from day 15 to day 27) administered. At the end of the experiment (28 d), significant effects caused by sLPS, FB, and by the interaction of sLPS*FB were observed on several parameters. Histopathological evaluations showed significant lesions in liver and kidney caused by sLPS, FB and their association. According to these results, both sLPS and FB (isolated or in association) cause significant effects on performance and biological parameters of broilers at 28 days of age.

Key Words: lipopolysaccharide, fumonisin, broiler, performance, biochemical analysis.

5.2. INTRODUCTION

Lipopolysaccharide (**LPS**) is the main component of Gram-negative bacterial cell wall, and is released during cellular division or bacterial death after lysis. LPS is also one of the most powerful activators of the immune system, leading to a non-specific inflammatory response (Buyse et al., 2007; Tuin, 2007; Shini et al., 2008; Liebers et al., 2008). Few studies are available regarding the effects of LPS on broilers performance, since earlier studies considered poultry as non-sensitive to LPS exposure (Roeder et al., 1989). Nevertheless, some researches relate LPS exposure to a list of effects in broilers and other avian species, such as hyperthermia, inflammation, cachexia, and eventually, death (Xie et al., 2000; Shini et al., 2008).

Fumonisin B₁ (**FB**) is a secondary metabolite produced by several *Fusarium* species. FB has been shown to be associated to some previously known diseases or syndromes, such as equine leucoencephalomalacia and porcine pulmonary edema (Li et al., 1999; Mallmann et al., 2010), and has been recently described as causing some effects in poultry as well (Henry et al., 2000; Mallmann et al., 2009). The main clinical signs of FB intoxication in broilers are reduced productive performance, ascites, kidney edema and congestion, diarrhea, increased relative weight of liver, and mortality (Mallmann et al., 2009).

Both LPS (Schierl et al., 2007) and FB (Mallmann et al., 2009) are constantly present and challenging broilers. It is well established that the co-administration of certain substances with modest doses of LPS turns those substances potentially hepatotoxic at non-hepatotoxic doses (Roth et al., 1997; Barton et al., 2000; Luyendyk et al., 2002). This research was developed to make available some information regarding the interaction of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide (**sLPS**) and FB on performance and physiological responses of broiler chickens.

5.3. MATERIAL AND METHODS

5.3.1. Feed Preparation and Mycotoxin

The feed for initial-phase broiler chickens was formulated to reach the nutritional requirements recommended by the NRC (1994), using basically corn, soybean meal, and vitamin-mineral premix. For dietary treatments with fumonisin (0, 100, or 200 mg FB₁/kg of feed), a *Fusarium verticilloides* (strain MRC 826) culture

material (**FCM**), which contained 5,715 mg FB₁/kg FCM, was incorporated to the diet. The diet also contained a certain amount of Fumonisins B₂ (0, 20, and 40 mg/kg of each feed), considered to be a less toxic metabolite of *F. verticilloides* (Kubena et al., 1995). All diets, feedstuffs, and FCM used in the experiment were previously screened for aflatoxins, fumonisins, zearalenone, cyclopiazonic acid, and trichothecenes according to Monbaliu et al. (2010). Assayed levels of aflatoxins, zearalenone, ciclopiazonic acid, and trichothecenes were below the detection limits of the methods used. Fumonisins levels assayed in the FCM and in the feed were those stated above.

*5.3.2. *Salmonella Typhimurium Lipopolysaccharide**

The sLPS was purchased from Sigma (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) and diluted in sterile saline solution to reach the desired concentration and achieve the dose for each treatment (0, 250, or 500 µg sLPS/application/bird). Each bird received 0.5 mL of its treatment solution (pure sterile saline, 500 µg/mL, or 1,000 µg/mL) every other day, starting at day 15 until the day 27 (7 applications). Solution of sLPS was administered to the birds using a variable volume calibrated micropipette, disposing the solution into the crop.

5.3.3. Animals and Experimental Protocol

Four hundred and thirty-two day-old Cobb male broiler chickens were randomly divided into 9 treatments with 6 replicate groups per treatment and 8 birds per replicate group. Broilers were kept in 54 electrically heated battery brooders with wired floors from 1 to 28 days of age. Experimental diets were given to the birds from when they were 1 day old until the end of the experiment. The animal care and use protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals on Research of the Federal University of Rio Grande do Sul under the process number 19847.

5.3.4. Body Performance

On the first day, the average body weight (**BW**) was 46.75 g, and there was no difference between treatments. At 14 days of experiment, before the first sLPS application (15 d), all broilers in the experiment were weighted to compare BW between

treatments receiving the same FB inclusion. No differences were observed between treatments. Broilers were monitored daily to evaluate the behavior and intoxication clinical signs for both FB and sLPS. At the end of the experiment (28 d), broilers were individually weighed and feed intake (**FI**) and feed conversion rate (**FCR**) were calculated for each replicate.

5.3.5. Necropsies and Pathologic Studies

At the end of the experiment, broilers were euthanized by cervical dislocation after desensitization with carbon dioxide. Livers from all birds were collected for relative weight (**RWL**) calculation. For histopathological evaluation, one fragment of thymus, bursa of Fabricius, spleen, heart, liver, pancreas, small intestine, kidney, and lung was collected from 6 broilers of each treatment and placed in buffered formaldehyde (10%) solution. Additionally, one fragment of the jejunum was collected from 18 broilers of each treatment and also placed in buffered formaldehyde (10%) solution for villus height (**VH**) and crypt depth (**CD**) measurement as well as villus-to-crypt (**V:C**) ratio. Organ fragments were processed following the usual histopathological techniques (Luna, 1968). Measurements of VH and CD were taken using the Motic Image Plus 2.0 software (Motic China Group Co. LTD. 2007), according to procedure previously described (Thompson and Applegate, 2006).

5.3.6. Serum Analysis

Blood samples were centrifuged 30 min after collection and maintained under -20°C until analyses were performed. Samples were submitted for clinical biochemistry and free sphinganine and sphingosine analysis for sphinganine-to-sphingosine (**SA:SO**) ratio calculation.

Clinical biochemistry analysis. Commercial kits (Labtest Diagnostica SA, Vista Alegre, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) were used to measure the levels of total plasma proteins (**TPP**), albumin (**Alb**), total cholesterol (**Col**), triglycerides (**Tri**), calcium (**Ca**), phosphorus (**Ph**), uric acid (**UA**), and C-reactive protein (**CRP**), and the activity of alanine aminotransferase (**ALT**), aspartate aminotransferase (**AST**), and alkaline phosphatase (**AP**).

Free sphinganine and sphingosine analysis for sphinganine-to-sphingosine ratio calculation. Extraction was performed as follows: 0.5 mL of the serum sample was mixed with 1.5 mL of 0.8% potassium chloride solution, 0.05 mL of potassium hydroxide solution, and 4.0 mL of ethyl acetate during 20 min by gentle shaking, centrifuged for 10 min under 2,500 rpm, after which the supernatant was collected. The extract was then dried and suspended in 0.5 mL of methanol. The methanol-suspended extract was submitted to analysis by HPLC tandem Mass Spectrometry (LC/MS-MS – API 5000 – Applied Biosystems) according to Lieser et al. (2003).

5.3.7. Statistical Analysis

Data obtained in this experiment were analyzed by the General Linear Models procedure (SAS, 1996), evaluating the effects of each factor (sLPS or FB) and the interaction between them (**sLPS*FB**). When data showed significance, means were compared by treatment using Bonferroni's multiple range test. Statistical significance was accepted as $P \leq 0.05$ and statistical analyses were performed in Statgraphics Centurion computer statistical program (Statgraphics Centurion 15.2.14, Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA).

5.4. RESULTS

Birds in this experiment did not show any clinical signs of sLPS or FB exposure in groups receiving those contaminants individually. However, birds receiving 200 mg/kg of FB associated either with 250 or 500 µg of sLPS/application showed some nonspecific clinical signs such as drowsiness, lethargy, ruffled feathers, and they tended to get clustered in the corners of the cages. No mortality was observed in this experiment.

FB caused effects in performance (decreased BW and FI; increased FCR) and on RWL (increase) (Table 11). No effect of sLPS in performance or RWL was observed and the interaction sLPS*FB significantly ($P \leq 0.05$) increased RWL, but had no effect on BW, FI, or FCR.

Data from serum analysis are presented on Tables 12, 13, and 14. Application of sLPS to the birds resulted in increased serum Ca, Col, Ph, CRP, and AST

levels and decreased UA and AP levels. No effect of sLPS was observed on serum TPP, Alb, Tri, ALT, and SA:SO ratio. FB contamination resulted in increased serum TPP, Alb, Col, Tri, Ca, CRP, ALT, AST, and SA:SO, decreased serum UA, and no effect on serum Ph and AP. Interaction of sLPS*FB resulted in increased serum Alb, Col, Ph, and CRP, decreased serum UA and no effect on serum TPP, Tri, Ca, ALT, AST, AP, and SA:SO.

Table 15 presents the results from VH, CD, and the relation between villus and crypt (villus-to-crypt ratio – V:C). No effects of sLPS or FB*sLPS were observed on those parameters. FB inclusion resulted in reduced VH and V:C.

On histological evaluations, no significant lesions were found in any tissue on the control group. For other treatments, no lesions were found on lungs, heart, spleen, thymus, pancreas, small intestine, and Bursa of Fabricius. On kidney, microscopic alterations consisted of a necrosis on the tubular epithelium (Figure 13). Between birds receiving 250 µg of sLPS, only one (out of six) showed this lesion, whilst in the other treatments at least four (out of six) showed such alteration. Lesions found on liver were hepatocellular vacuolization, hyperplasia of biliary ducts, hepatocellular degeneration, proliferation of biliary ducts, and lymphoid hyperplasia (Figure 14). Those lesions were found in combination in birds from all treatments receiving either sLPS or FB.

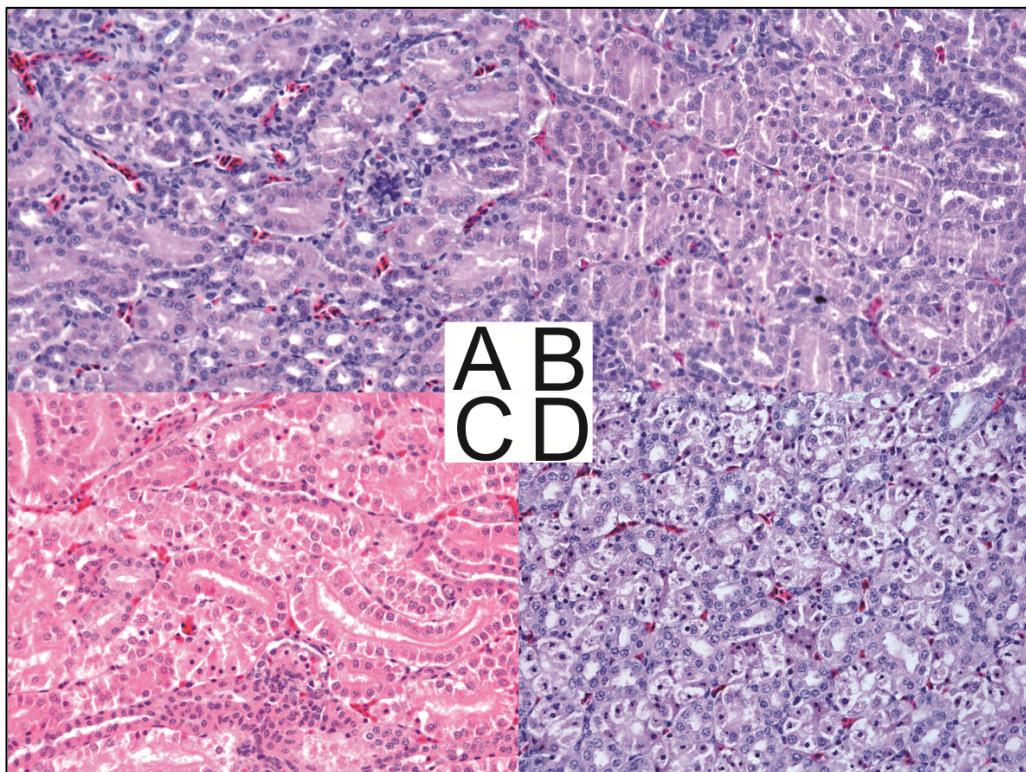


FIGURE 13 - Microscopic aspect of kidneys from broilers of the control group (A) or receiving 500 µg of sLPS (B), 200 mg/kg of FB (C) or the association of sLPS and FB (D).

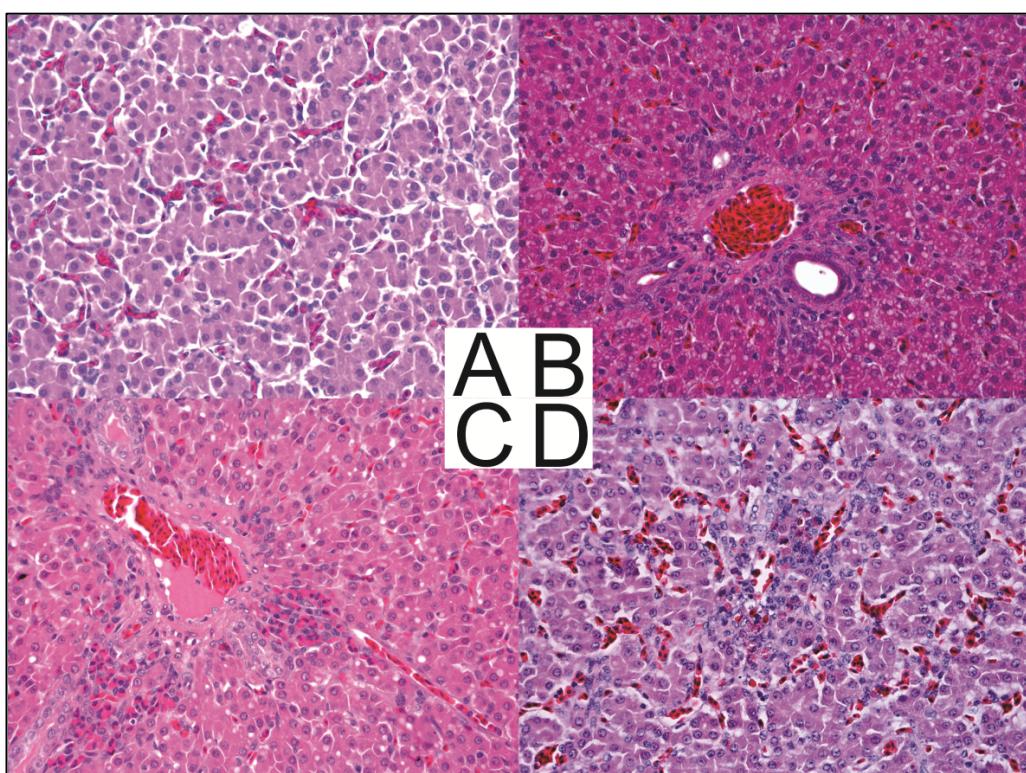


FIGURE 14 - Microscopic aspect of liver from broilers of the control group (A) or receiving 500 µg of sLPS (B), 200 mg/kg of FB (C) or the association of sLPS and FB (D).

5.5. DISCUSSION

The results obtained in the present study indicate that both sLPS and FB, as well as the combination sLPS*FB, have toxic effects on broilers performance and induce several biological changes. No significant effect of sLPS or the interaction between sLPS and FB were observed on performance results (BW, FI, and FCR), whilst FB had a significant effect on all performance results. Despite that, no difference was observed between FB inclusions (100 and 200 mg/kg) on BW, FI, and FCR. The isolated effect of FB on boilers performance have been previously reported under FB contamination ranging from 10 to 400 mg/kg of feed (Ledoux et al., 1992; Kubena et al., 1997). Those papers reported a decreased BW gain and FI after at least 2 weeks of exposure. The reduced BW gain in the present experiment can be partly explained by the reduced FI, but also by the action of FB on several tissues (mainly the liver and kidneys), stimulating apoptosis and/or mitosis (Voss et al., 2007). The change on FCR can be partially explained by the reduced villus-to-crypt ratio (discussed below), which leads to a poor absorption of nutrients from the feed. Buyse et al. (2007) applying 300 µg of LPS (from *E. coli*) subcutaneously at once and Takahashi et al. (1995) using 3 intraperitoneal injections with 900 µg of LPS (from *E. coli*) every 2 days did not observe any effect on BW and FI after 10 d or 6d respectively. However, Xie et al. (2000), using a considerably much higher dose of sLPS (nearly 3,450 µg/bird) achieved a reduced BW gain within 12 hours post intraperitoneal injection.

The increased RWL caused by FB occurred probably because the main organ responsible for FB detoxification is the liver (Voss et al., 2007) and it has been reported previously (Kubena et al., 1997; Ledoux et al., 1992). In this experiment, the inclusions of FB (100 versus 200) resulted in differences on RWL. sLPS has no effect on RWL by itself, but seems to potentiate (sLPS*FB) the effect of FB on this parameter. It is well-known that the exposure to LPS augments liver injury induced by several contaminants such as chlorpromazine, ethionine, deoxynivalenol, monocrotaline, and aflatoxins (Roth et al., 1997). Those researchers raised the possibility of this to be a secondary effect originated indirectly from primary damage of LPS to the gut. However, in this experiment, no damaging effects of sLPS were observed either on histological evaluation or on VH and CD measurements (Table 15).

Serum levels of TPP and Alb were affected by FB and Alb levels were also affected by the association sLPS*FB (Table 12). Kubena et al. (1997) had similar

results on TPP levels in broiler receiving 300 mg FB/kg of feed during 21 d. Ramasamy et al. (1995) tested in vitro the effects of FB on endothelial cells from porcine pulmonary artery and observed an increased permeability of the endothelium to Alb. This increased permeability to Alb can explain the elevation on serum levels of both, TPP and Alb by FB. Somehow, when associated with FB, sLPS appears to potentiate the effect of FB on Alb levels. Increased levels of Ca (Table 12) are generally associated with hyperalbuminemia (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008).

Hypercholesterolemia, hypouricemia (Table 13), increased levels of Tri (Table 12), and increased serum activity of AST (Table 14) are generally associated with liver damage (Hochleithner, 1994; Harr, 2002). Similar results on AST activity and Col levels in serum of broilers receiving 100, 200, 300, and 400 mg FB/kg of feed (Ledoux et al., 1992) and receiving 300 mg FB/kg (Kubena et al., 1997) have been previously reported. According to Voss et al. (2007) and as stated above on RWL, the target organ of FB is the liver, and as previously described (Roth et al., 1997), the co administration of LPS with hepatotoxic substances can increase liver damage, which is clearly elucidated with the effect of sLPS*FB association on serum levels of Col and UA and on RWL.

The evaluation of ALT activity on broilers is poor because it is distributed between several tissues, and increased activity of ALT is generally associated with nonspecific cell damage. Changes in AP activity are associated with cellular activity (rather than cell damage) mainly in the duodenum and kidney, suggesting that the reduced activity of AP caused by sLPS reflects a reduction on cellular activity (Hochleithner, 1994). The effect of FB observed on ALT activity (Table 14) can be explained as long as the main action mechanism of FB is to induce apoptosis and/or mitosis through the inhibition of ceramide synthase enzyme and sphinganine accumulation in cells. This mechanism occurs in several organs, but mainly in the liver and kidney (Voss et al., 2007).

The observed hyperphosphatemia in this experiment is probably due to reduced Ph excretion in the kidney. This effect is commonly observed during an acute phase inflammatory reaction (Xie et al., 2000), and in cases of renal failure (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008). It can also be explained by the necrosis observed in the tubular epithelium.

CRP is an acute phase protein in inflammatory responses. It is associated with various inflammatory conditions as a positive acute phase protein and plays an

important role in the protection against infection, clearance of damaged tissue, prevention of autoimmunity and regulation of the inflammatory responses. CRP is mainly stimulated by the secretion of interleucine-1 (IL-1) and IL-6, and its major function is to bind to foreign pathogens and damaged host cells to initiate their elimination (Juul-Madsen et al., 2008). The effects of sLPS, which induces the secretion of both IL-1 and IL-6 after entering the hosts cells (Xie et al., 2000; Tuin, 2007; Liebers et al., 2008), and of FB, which leads to both apoptotic and oncotic necrosis and demanding a host response (Dragan et al., 2001), can also be characterized as inflammatory responses due to the elevation on CRP levels observed in broilers receiving those contaminants either isolated or in association. Besides causing a significant effect on this parameter, FB contamination alone or associated with sLPS did not result in differences on CRP levels. Only the highest dose of sLPS alone (500 µg) resulted in significant difference from the control group.

SA:SO ratio has been used widely as a specific biomarker to FB exposition in many species, including broiler (Henry et al., 2000; Broomhead et al., 2002; Tran et al., 2003; Voss et al., 2007), and it is due to the competitive inhibition of the enzyme ceramide synthase and the immediate accumulation of sphinganine (SA) in tissues, serum and urine (Voss et al., 2007). FB contamination resulted in increased SA:SO ratio when compared to the control group, however did not differ under the FB inclusions used in this experiment (100 or 200 mg/kg).

Biodistribution of FB in poultry is restricted to gastrointestinal tract (crop, small intestine and cecum), liver, and kidney (Voss et al., 2007). Reduction on VH has been previously described *in vivo* in pigs (Dilkin et al., 2004), and *in vitro* in porcine intestinal epithelial cells (Bouhet et al., 2004). The effects of FB on VH and V:C ratio observed in this experiment can explain in part the effect of FB on FCR.

The lesions found in liver and kidney of birds receiving sLPS, FB, or the combination sLPS*FB confirm that the main target organs of both sLPS and FB are the liver and the kidneys. Similar results on liver histological evaluation of broilers receiving FB have been previously described (Ledoux et al., 1992), as well as in kidneys (Henry et al., 2000). However, some researches did not find any microscopic alterations on any tissue (Kubena et al., 1995; Broomhead et al., 2002). Liver histological alterations caused by LPS have been proved in rats by Barton et al. (2000). Xie et al. (2000) attributed some of the changes observed in broilers to a transient impairment of kidney function noted during acute phase reaction. No relationship was

observed between the doses of sLPS or FB applied to the birds and the intensity of microscopic lesions in both liver and kidneys.

5.6. CONCLUSIONS

The findings on the present study show that FB has a significant negative effect on broilers performance and on several biological parameters. The effects of sLPS isolated are more subtle than those of FB. However, it has to be considered as an important co-agent with other contaminants, mainly those metabolized in the liver, due to its capability of increasing liver injury, as showed by the results of the combination sLPS*FB. Also, for both contaminants, the main target organs are the liver and the kidneys.

5.7. REFERENCES

- Barton, C. C., D. A. Hill, S. B. Yee, E. X. Barton, P. E. Ganey, and R. A. Roth. 2000. Bacterial lipopolysaccharide exposure augments aflatoxin B1-induced liver injury. *Toxicol. Sci.* 55:444-452.
- Bouhet, S., E. Hourcade, N. Loiseau, A. Fikry, S. Martinez, M. Roselli, P. Galtier, E. Mengheri, and I. P. Oswald. 2004. The mycotoxin fumonisin B1 alters the preproliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 77:165-171.
- Broomhead, J. N., D. R. Ledoux, A. J. Bermudez, and G. E. Rottinghaus. 2002. Chronic effects of Fumonisin B1 in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poult. Sci.* 81:56-61.
- Buyse, J., Q. Swennen, T. A. Niewold, K. C. Klasing, G. P. J. Janssens, M. Baumgartner, and B. M. Goossens. 2007. Dietary L-carnitine supplementation enhances the Lipopolysaccharide-induced acute phase protein response in broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118:154-159.
- Dilkin, P., R. Hassegawa, T. A. Reis, C. A. Mallmann, and B. Corrêa. 2004. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. *Ciência Rural.* 34:175-181.
- Dragan, Y. P., W. R. Bidlack, S. M. Cohen, T. L. Goldsworthy, G. C. Hard, P. C. Howard, R. T. Riley, and K. A. Voss. 2001. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: Fumonisin B1 as an example. *Toxicol. Sci.* 61:6-17.
- Harr, K. E. 2002. Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet. Clin. Pathol.* 31:140-151.

- Henry, M. H., R. D. Wyatt, and O. J. Fletcher. 2000. The toxicity of purified Fumonisin B₁ in broiler chicks. *Poult. Sci.* 79:1378-1384.
- Hochleithner, M. 1994. Biochemistries. Pages 223-245 in Avian medicine and surgery: principles and applications. Ritchie B. W., G. J. Harrison, and L. R. Harrison. Wingers Publishing Inc, Lake Worth.
- Juul-Madsen, H. R., B. Viertlboeck, A. L. Smith, and T. W. F. Göbel. 2008. Avian innate immune responses. Pages 129-158 in Avian Immunology. Davison, F., B. Kaspers, K. A. Schat. Elsevier, San Diego, CA.
- Kubena, L. F., T. S. Edrington, C. Kamps-Holtzapple, R. B. Harvey, M .H. Elissalde, and G. E. Rottinghaus. 1995. Effects of feeding Fumonisin B₁ present in *Fusarium verticilloides* culture material and Aflatoxin singly and in combination to turkey poult. *Poult. Sci.* 74:1295-1303.
- Kubena, L. F., T. S. Edrington, R. B. Harvey, S. A. Buckley, T. D. Phillips, G. E. Rottinghaus, and H. H. Casper. 1997. Individual and combined effects of Fumonisin B1 present in *Fusarium verticilloides* culture material and T-2 toxin or Deoxynivalenol in broiler chicks. *Poult. Sci.* 76:1239-1247.
- Ledoux, D. R., T. P. Brown, T. S. Weibking, and G. E. Rottinghaus. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:330-333.
- Li Y. C., D. R. Ledoux, A. J. Bermudez, K. L. Fritsche, and G. E. Rottinghaus. 1999. Effects of Fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78:1275-1282.
- Liebers, V., M. Raulf-Heimsoth, and T. Brüning. 2008. Health effects due to Endotoxin inhalation (review). *Arch. Toxicol.* 82:203-210.
- Lieser, B., G. Liebisch, W. Drobnik, and G. Schmitz. 2003. Quantification of sphinganine and sphingosine from crude extracts by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 44:2209-2216. Doi:10.1194/jlr.D300025-JLR200
- Lumeij, J. T. 2008. Avian Clinical Biochemistry. Pages 839-872 in Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Kaneko, J. J., J. W. Harvey, and M. L. Bruss. 6th Ed. Elsevier, San Diego, CA
- Luna, G. C. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Luyendyk, J. P., K. C. Shores, P. E. Ganey, and R. A. Roth. 2002. Bacterial lipopolysaccharide exposure alters aflatoxin B1 hepatotoxicity: Benchmark dose analysis for markers of liver injury. *Toxicol. Sci.* 68:220-225.
- Mallmann, C. A., P. Dilkin, and R. H. Rauber. 2009. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. Pages 821-832. In Doenças das Aves. Berchieri Júnior, A., E. N. Silva, J. Di Fábio, L. Sesti, and M. A. F. Zuanaze. 2nd Ed. FACTA, Campinas, SP, Brazil.

- Mallmann, C. A., P. Dilkin, R. H. Rauber, and L. Z. Giacomini. 2010. Mycotoxicosis in swine. Pages 67-95 in Mycotoxicoses in animals economically important. E. Gonçalvez, J. D. Felicio, and S. Aquino. Nova Science Publishers, Inc, New York, NY.
- Monbaliu, S., C. Van Poucke, C. Detavernier, F. Dumoulin, M. Van de Velde, E. Schoeters, S. Van Dyck, O. Averkieva, C. Van Peteghem, S. De Saeger. 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 58:66-71.
- NRC. 1994. Nutrient Requirement of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ramasamy, S., E. Wang, B. Henning, and A. H. Merril Jr. 1995. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133:343-348.
- Roeder, D. J., M. Lei, and D. C. Morrison. 1989. Endotoxic-Lipopolysaccharide-Specific binding protein on lymphoid cells of various animal species: association with endotoxin susceptibility. *Infect. Immun.* 57:1054-1058.
- Roth, R. A., J. R. Harkema, J. P. Pestka, and P. E. Ganey. 1997. Is exposure to Bacterial Endotoxin a Determinant of Susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol. App. Pharmacol.* 147:300-311.
- Schierl, R., A. Heise, U. Egger, F. Schneider, R. Eichelser, S. Neser, and D. Nowak. 2007. Endotoxin concentration in modern animal houses in southern bavaria. *Ann. Agric. Environ. Med.* 14:129-136.
- Shini, S., P. Kaiser, A. Shini, and W. L. Bryden. 2008. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 149:324-333.
- Takahashi, K., S. Yodogawa, and Y. Akiba. 1995. Effect of dietary protein concentration on responses to *Escherichia coli* Endotoxin in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 74:173-182.
- Thompson, K. L. and T. J. Applegate. 2006. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poult. Sci.* 85:1535-1540.
- Tran, S. T., J. D. Bailly, D. Tardieu, S. Durand, G. Benard, and P. Guerre. 2003. Shinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks. *Chem. Biol. Interac.* 146:61-72.
- Tuin, A. 2007. Detoxification of LPS by alkaline phosphatase: application of a new concept in sepsis and inflammatory bowel disease. PhD Diss. University of Groningen, Groningen, Netherlands. 192 p.
- Voss, K. A., G. W. Smith, and W. M. Haschek. Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:299-325.
- Xie, H., N. C. Rath, G. R. Huff, W. E. Huff, and J. M. Balog. 2000. Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poult. Sci.* 79:33-40.

TABLE 11 - Performance and relative weight of liver of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of *Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide and fumonisin B₁*.

sLPS ¹	FB ²	Body Weight ³	Feed Intake ⁴	Feed Conversion Rate ⁵	Relative Weight of Liver ⁶
0	0	1450.1 ± 15.8 ^a	2375.8 ± 30.4 ^a	1.64 ± 0.02 ^b	2.68 ± 0.04 ^C
250	0	1422.0 ± 19.3	2379.5 ± 21.6	1.67 ± 0.02	2.65 ± 0.05 ^C
500	0	1395.7 ± 21.8	2326.3 ± 32.7	1.66 ± 0.01	2.94 ± 0.07 ^{BC}
0	100	1225.6 ± 21.0 ^b	2205.5 ± 33.4 ^b	1.81 ± 0.04 ^a	3.30 ± 0.09 ^B
0	200	1189.6 ± 25.2 ^b	2137.5 ± 36.9 ^b	1.77 ± 0.02 ^a	3.89 ± 0.12 ^A
250	100	1191.6 ± 19.3	2196.5 ± 41.4	1.86 ± 0.06	3.25 ± 0.08 ^B
250	200	1154.1 ± 18.3	2077.0 ± 27.3	1.77 ± 0.01	3.68 ± 0.10 ^A
500	100	1173.0 ± 21.3	2109.5 ± 49.7	1.77 ± 0.03	3.09 ± 0.07 ^B
500	200	1130.4 ± 21.3	2072.5 ± 35.5	1.78 ± 0.03	3.81 ± 0.10 ^A
General Linear Models					
P_{sLPS}		0.06	0.19	0.98	0.14
P_{FB}		0.00	0.00	0.01	0.00
P_{sLPS*FB}		0.91	0.83	0.91	0.04

* Values are presented as means ± SE.

^{a-b} Averages with different superscripts within the same column differ within FB inclusions under Bonferroni's test ($P \leq 0.05$).

^{A-C} Averages with different superscripts within the same column differ within the sLPS*FB interaction under Bonferroni's test ($P \leq 0.05$).

¹ sLPS= Dose of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg). Broilers received contaminated feed from 1 to 28 days.

³ Mean body weight (g).

⁴ Mean feed intake (g/bird).

⁵ Mean feed conversion rate (g/g).

⁶ Mean relative weight of liver (g/100g of body weight).

TABLE 12 - Serum levels of total plasma protein, albumin, calcium, and triglyceride of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B₁*.

sLPS ¹	FB ²	TPP ³	Alb ⁴	Ca ⁵	Tri ⁶
0	0	3.89 ± 0.12 ^b	1.43 ± 0.06 ^{CD}	9.19 ± 0.34 ^{b/x}	61.01 ± 4.87 ^b
250	0	3.92 ± 0.18	1.36 ± 0.05 ^D	9.72 ± 0.32 ^x	71.56 ± 5.30
500	0	3.81 ± 0.19	1.46 ± 0.08 ^{CD}	9.89 ± 0.43 ^x	64.68 ± 4.41
0	100	4.13 ± 0.17 ^{ab}	1.76 ± 0.06 ^{BC}	9.92 ± 0.34 ^b	90.04 ± 6.17 ^a
0	200	4.68 ± 0.23 ^a	2.13 ± 0.10 ^A	11.41 ± 0.26 ^a	84.99 ± 4.66 ^a
250	100	4.73 ± 0.21	1.91 ± 0.09 ^{AB}	10.55 ± 0.33	55.43 ± 3.72
250	200	4.24 ± 0.16	1.63 ± 0.08 ^{BCD}	12.17 ± 0.32	64.40 ± 3.31
500	100	4.81 ± 0.22	1.69 ± 0.07 ^{BCD}	11.86 ± 0.27	64.68 ± 3.24
500	200	4.11 ± 0.21	1.55 ± 0.08 ^{CD}	12.32 ± 0.35	72.82 ± 5.41
General Linear Models					
P _{sLPS}	0.24	0.28	<0.01	0.63	
P _{FB}	<0.01	0.00	0.00	0.02	
P _{sLPS*FB}	0.19	<0.01	0.79	0.14	

* Values are presented as means ± SE.

^{a-b} Averages with different superscripts within the same column differ within FB inclusions under Bonferroni's test (P≤0.05).

^x Averages with same superscripts within the same column do not differ within sLPS inoculations under Bonferroni's test (P≤0.05).

^{A-C} Averages with different superscripts within the same column differ within the sLPS*FB interaction under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ sLPS= Dose of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg). Broilers received contaminated feed from 1 to 28 days.

³ Mean serum levels of total plasma proteins (g/dL).

⁴ Mean serum levels of albumin(g/dL).

⁵ Mean serum levels of calcium (mg/dL).

⁶ Mean serum levels of triglyceride (mg/dL).

TABLE 13 - Serum levels of total cholesterol, phosphorus, uric acid and C-reactive protein of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B₁*.

sLPS ¹	FB ²	Col ³	Ph ⁴	UA ⁵	CRP ⁶
0	0	115.25 ± 3.66 ^E	11.59 ± 0.47 ^{BC}	7.33 ± 0.50 ^A	144.0 ± 18.1 ^B
250	0	123.91 ± 5.69 ^{DE}	13.40 ± 0.42 ^{AB}	6.92 ± 0.25 ^{AB}	163.2 ± 14.7 ^B
500	0	136.38 ± 4.97 ^{CDE}	14.52 ± 0.62 ^A	5.88 ± 0.30 ^{ABC}	312.0 ± 35.1 ^A
0	100	172.19 ± 7.61 ^B	12.42 ± 0.48 ^{ABC}	6.89 ± 0.35 ^{AB}	218.7 ± 44.6 ^{AB}
0	200	214.01 ± 8.52 ^A	13.07 ± 0.22 ^{ABC}	5.99 ± 0.29 ^{ABC}	245.3 ± 36.2 ^{AB}
250	100	158.14 ± 7.16 ^{BCD}	12.88 ± 0.56 ^{ABC}	4.45 ± 0.29 ^C	180.0 ± 12.0 ^{AB}
250	200	175.49 ± 8.45 ^B	10.87 ± 0.33 ^C	6.46 ± 0.42 ^{AB}	168.0 ± 15.7 ^B
500	100	163.77 ± 7.83 ^{BC}	12.71 ± 0.37 ^{ABC}	5.53 ± 0.36 ^{BC}	172.8 ± 12.8 ^B
500	200	179.41 ± 9.65 ^{AB}	12.22 ± 0.53 ^{BC}	6.65 ± 0.46 ^{AB}	274.3 ± 38.8 ^{AB}
General Linear Models					
P_{sLPS}		0.03	0.00	<0.01	<0.01
P_{FB}		0.00	0.34	<0.01	0.02
P_{sLPS*FB}		<0.01	<0.01	<0.01	0.02

* Values are presented as means ± SE.

A-D Averages with different superscripts within the same column differ within the sLPS*FB interaction under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ sLPS= Dose of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg). Broilers received contaminated feed from 1 to 28 days.

³ Mean serum levels of total cholesterol (mg/dL).

⁴ Mean serum levels of phosphorus (mg/dL).

⁵ Mean serum levels of uric acid (mg/dL).

⁶ Mean serum levels of C-reactive protein (mg/L).

TABLE 14 - Serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase, and sphinganine-to-sphingosine ratio of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B₁*.

sLPS ¹	FB ²	ALT ³	AST ⁴	AP ⁵	SA:SO ⁶
0	0	14.00 ± 1.13 ^b	248.92 ± 10.10 ^{b/y}	2756.6 ± 167.3 ^x	0.47 ± 0.05 ^b
250	0	15.74 ± 1.59	297.80 ± 8.98 ^x	2066.2 ± 224.8 ^{xy}	0.49 ± 0.06
500	0	14.28 ± 1.40	294.79 ± 13.17 ^x	1872.0 ± 215.9 ^y	0.37 ± 0.04
0	100	18.56 ± 1.82 ^b	304.85 ± 12.94 ^a	2783.3 ± 156.5	1.59 ± 0.08 ^a
0	200	25.69 ± 2.67 ^a	319.99 ± 16.79 ^a	2442.2 ± 200.0	1.75 ± 0.08 ^a
250	100	20.85 ± 1.91	353.92 ± 17.79	1425.7 ± 173.2	1.71 ± 0.08
250	200	19.71 ± 1.64	407.39 ± 19.12	1917.6 ± 232.7	1.81 ± 0.09
500	100	19.07 ± 1.78	370.15 ± 15.98	**	1.63 ± 0.11
500	200	28.86 ± 2.21	342.99 ± 18.20	1744.2 ± 197.9	1.87 ± 0.09
General Linear Models					
P _{sLPS}	0.96	0.01	<0.01	0.49	
P _{FB}	<0.01	<0.01	0.31	0.00	
P _{sLPS*FB}	0.46	0.50	0.65	0.35	

* Values are presented as means ± SE.

** Data excluded from analysis due to high coefficient of variation (143%).

a-b Averages with different superscripts within the same column differ within FB inclusions under Bonferroni's test (P≤0.05).

x-y Averages with different superscripts within the same column differ within sLPS inoculations under Bonferroni's test (P≤0.05).

¹ sLPS= Dose of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg). Broilers received contaminated feed from 1 to 28 days.

³ Mean serum activity of alanine aminotransferase (U/L).

⁴ Mean serum activity of aspartate aminotransferase (U/L).

⁵ Mean serum activity of alkaline phosphatase (U/L).

⁶ Mean serum sphinganine-to-sphingosine ratio.

TABLE 15 - Measurements of villus height, crypt depth, and villus-to-crypt ratio of 28 day-old male broiler chickens receiving a combination of three doses of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide and fumonisin B₁*.

sLPS ¹	FB ²	VH ³	CD ⁴	V:C ⁵
0	0	1.40 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.008	10.89 ± 0.61 ^a
250	0	1.49 ± 0.03	0.13 ± 0.006	12.00 ± 0.60
500	0	1.27 ± 0.04	0.13 ± 0.005	10.10 ± 0.53
0	100	1.24 ± 0.07 ^{ab}	0.13 ± 0.005	9.27 ± 0.42 ^{ab}
0	200	1.18 ± 0.02 ^b	0.13 ± 0.006	9.16 ± 0.34 ^b
250	100	1.46 ± 0.05	0.20 ± 0.013	7.72 ± 0.76
250	200	1.46 ± 0.03	0.21 ± 0.009	7.17 ± 0.38
500	100	1.29 ± 0.06	0.13 ± 0.003	10.04 ± 0.54
500	200	1.19 ± 0.07	0.12 ± 0.009	9.75 ± 0.38
General Linear Models				
P_{sLPS}		0.09	0.59	0.43
P_{FB}		<0.01	0.12	<0.01
P_{sLPS*FB}		0.12	0.84	0.23

* Values are presented as means ± SE.

^{a-b} Averages with different superscripts within the same column differ within FB inclusions under Bonferroni's test ($P \leq 0.05$).

¹ sLPS= Dose of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide applied to each bird, every other day, from 15 to 27 days of age (μg/application/bird).

² FB= Fumonisin B₁ contamination in feed (mg/kg). Broilers received contaminated feed from 1 to 28 days.

³ Mean villus height (mm).

⁴ Mean crypt depth (mm).

⁵ Mean villus-to-crypt ratio.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de descritos na literatura, sinais clínicos da intoxicação com o lipopolissacarídeo (LPS) (BENITES & MELVILLE, 2008; GUAIUME, 2005; XIE et al., 2000) ou com a fumonisina B₁ (FB) (MALLMANN et al., 2009; HOERR, 2003; HENRY et al., 2000) não foram observados neste trabalho, quando da administração individual de cada substância às aves. No estudo envolvendo a associação das duas toxinas, as aves apresentaram sinais clínicos inespecíficos, quando receberam a dose mais alta de FB (200 mg/kg), associada a ambas as doses de sLPS (250 e 500 µg/aplicação). Tais sinais clínicos consistiram de sonolência, letargia, penas arrepiadas e amontoamento das aves nos cantos das gaiolas.

Mesmo sem a apresentação de sinais clínicos clássicos, os resultados apresentados ao longo dos trabalhos acima indicam que tanto o sLPS quanto a FB, isoladas ou em associação, têm efeitos deletérios sobre o desempenho de frangos de corte, bem como induzem várias alterações biológicas nestes animais. O efeito isolado da FB sobre o desempenho de frangos de corte foi anteriormente relatado com contaminações variando de 10 a 400 mg/kg (KUBENA et al., 1997; LEDOUX et al., 1992). Estes autores relatam uma redução no ganho de peso e no consumo de ração após duas semanas de intoxicação. Os resultados encontrados na literatura acerca do efeito do LPS sobre o desempenho de frangos são um tanto controversos, uma vez que Buyse et al. (2007) e Takahashi et al. (1995) não observaram efeitos do LPS sobre consumo de ração e peso corporal nestes animais, enquanto que Xie et al. (2000) observou uma redução no ganho de peso das aves.

As condições de alojamento das aves neste estudo, no que tange à ambiência (Figura 15), lotação e fornecimento água e alimento, podem ser consideradas muito próximas de uma condição ideal de criação, ou seja, foram obedecidos todos os requerimentos para uma ótima condição de bem-estar e conforto a estas aves. Conforme apontado por Mallmann et al. (2009), em condições tais quais as observadas nesta pesquisa, as doses de FB e outras toxinas requeridas para que seja observado algum sinal clínico específico podem ser maiores do que aquelas comumente observadas no campo. Mesmo assim, a associação de sLPS e FB demonstrou ter impacto sobre as aves de uma forma mais intensa em relação ao observado nos estudos onde estas toxinas foram utilizadas isoladamente.

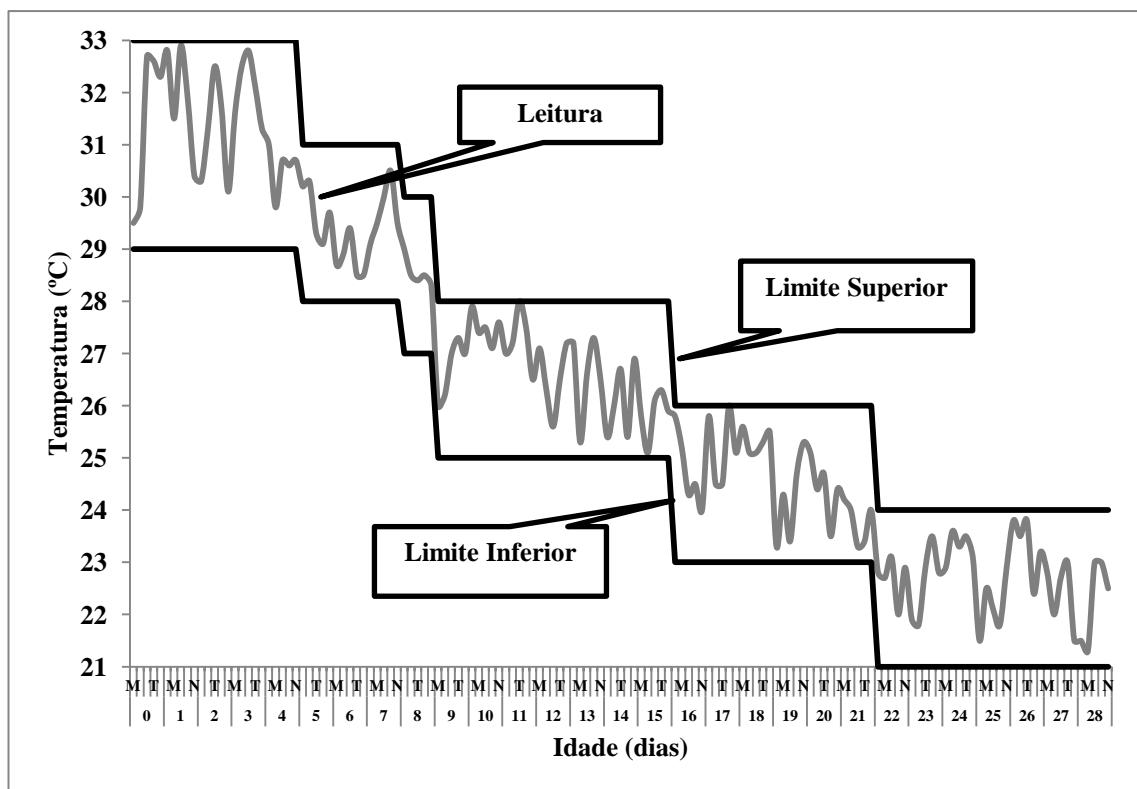


FIGURA 15 - Limites inferior e superior de temperatura de conforto térmico para frangos de corte, conforme a idade, e temperatura ambiental observada (leitura) durante o experimento.

Dos 19 parâmetros mensurados nesta pesquisa, todos foram afetados pela presença do sLPS ou da FB, ou pela associação de ambos. O que chama à atenção é a possibilidade de uma destas substâncias não causar efeito sobre determinado parâmetro, mas, quando associada à outra, potencializar o efeito da segunda, como é o caso do peso relativo do fígado e dos níveis séricos de albumina, que foram afetados pela FB, e pela associação de ambas, mas não pelo sLPS isoladamente. Da mesma forma, os níveis de fósforo foram afetados pelo sLPS, sendo este efeito potencializado pela presença concomitante da FB, mas não tendo a FB efeito sobre os níveis de fósforo quando utilizada isoladamente.

Outro achado importante é o impacto de ambas as substâncias sobre determinados parâmetros quando avaliadas isoladamente, sem que, no entanto, haja um efeito associado quando da aplicação concomitante de sLPS e FB. Este é o caso do peso corporal, níveis séricos de cálcio e atividade sérica da AST.

Uma série de parâmetros de bioquímica clínica avaliados nesta sequencia de trabalhos indica que tanto o sLPS quanto a FB têm como principais órgãos alvo o

fígado e os rins, dentre os quais, podemos citar (segundo HOCHLEITHNER, 1994; LUMEIJ, 2008):

- a. Níveis ou atividades sorológicas aumentadas de colesterol total, triglicerídeos e aspartato aminotransferase e níveis sorológicos diminuídos de ácido úrico estão normalmente associadas a dano hepático;
- b. Níveis ou atividades sorológicas diminuídas de fósforo e fosfatase alcalina, bem como atividade sorológica aumentada de aspartato aminotransferase normalmente indicam lesão renal em aves;

Os resultados obtidos das avaliações histológicas em vários tecidos (timo, bursa de Fabricius, baço, coração, fígado, pâncreas, intestino delgado, rins e pulmões) indicaram somente lesões significativas em fígado e rins, comprovando também a ação, tanto do sLPS como da FB sobre estes órgãos.

Além de fígado e rins, a FB também apresenta efeito deletério sobre o intestino das aves, determinando uma redução na altura das vilosidades e, consequentemente, uma redução na relação vilosidade:cripta (Tabela 15), o que, segundo Gao et al. (2008), representa uma redução na qualidade geral do intestino. Este efeito sobre a mucosa intestinal causa uma piora na conversão alimentar das aves, observada também neste estudo e causada somente pela FB (Tabela 11). O efeito da FB no intestino parece estar associado mais a uma redução na atividade celular dos enterócitos do que a uma lesão tecidual propriamente dita, uma vez que não foi observada nenhuma alteração histológica nos fragmentos de intestino avaliados.

Como referido anteriormente, os níveis séricos de cálcio podem ter relação direta com os níveis de albumina (HOCHLEITNER, 1994; LUMEIJ, 2008). Tomando como base os resultados de albumina e cálcio obtidos do grupo controle desta pesquisa aos 28 dias, obtém-se um coeficiente de correlação positivo de 0,76 ($R=0,76$; $P<0,01$; Cálcio= $3,52 + 3,92 \cdot \text{Albumina}$) na análise de regressão linear simples, indicando que o aumento nos níveis de cálcio é acompanhado de um aumento nos níveis de albumina.

Muitas vezes, a simples constatação da presença de determinadas bactérias (prevalência) no ambiente de criação das aves, ou nas próprias aves, não tem um significado importante do ponto de vista do efeito destas bactérias (ou suas toxinas) para as aves. No entanto, medidas que possam reduzir a contagem bacteriana nestes

casos, particularmente de bactérias gram-negativas como a *Salmonella Typhimurium*, podem colaborar com a redução no desafio das aves pelo sLPS.

A opção pela utilização de medidas que possam diminuir a contagem de bactérias nos ambientes avícolas é de suma importância no que diz respeito ao desafio por sLPS, uma vez que não existem meios comprovados de eliminar o sLPS do ambiente. Da mesma forma, pela característica inespecífica dos sinais clínicos da intoxicação pelo sLPS, o tratamento, apesar de ser sintomático, normalmente não é aplicado, pois os sinais são atribuídos a diversos outros fatores que não à endotoxina.

No caso das fumonisinas, o tratamento dos animais afetados, normalmente, consiste da retirada do alimento contaminado ou, nos casos em que há monitoria da qualidade micotóxico-lógica das dietas produzidas e oferecidas às aves, do uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM) com a finalidade de sequestrar e/ou inativar estes contaminantes antes de serem absorvidos pelas aves.

Pelos resultados apresentados nesta sequência de artigos (Tabelas 2 a 15), fica evidente que tanto sLPS quanto FB têm efeitos deletérios importantes em frangos de corte. Tem relevante importância, também, o fato de que a associação entre sLPS e FB demonstrou potencial sinérgico sobre alguns parâmetros avaliados. Este resultado pode ser extrapolado para o campo, onde normalmente as aves estão sujeitas à ingestão de ração contaminada com fumonisinas, bem como se encontram em um ambiente potencialmente contaminado com bactérias gram-negativas e, em última análise, com LPS, e comprovar que determinados problemas de desempenho, ou mesmo sanitários, podem ser decorrentes da associação entre estas substâncias, ou mesmo da associação destas com outros contaminantes e agentes microbianos que desafiam as aves.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nas condições deste trabalho, pode-se concluir que:

1. A inoculação de Lipopolissacarídeo de *Salmonella Typhimurium* (sLPS), a cada 48 horas, a partir do 15º dia de vida, determina efeitos negativos significativos sobre o desenvolvimento de frangos de corte, durante os primeiros 28 dias de vida:
 - a. Peso corporal, mas não consumo de ração e conversão alimentar, sofre efeito negativo significativo em função das doses de sLPS inoculadas nas aves.
 - b. Parâmetros de bioquímica clínica avaliados no soro e afetados pela inoculação de sLPS nas aves são colesterol total, fósforo, ácido úrico, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Não são evidenciados efeitos significativos sobre os níveis de proteínas plasmáticas totais, albumina, triglicerídeos e cálcio e sobre as atividades das enzimas aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase.
 - c. A inoculação de sLPS nas aves induz o organismo a uma reação inflamatória aguda intensa, comprovada pela elevação nos níveis de Proteína C-reativa nas aves inoculadas.
 - d. Os órgãos afetados pela inoculação com sLPS são fígado e rins, comprovado pelas alterações nos parâmetros de bioquímica clínica e nos achados histológicos nestes órgãos. Não há efeitos significativos da inoculação com sLPS nos outros órgãos avaliados (Bursa de Fabrício, timo, baço, coração, pâncreas, intestino delgado e pulmões).
2. A presença de fumonisina B₁ (FB) na dieta das aves, a partir do primeiro dia de vida, até o 28º dia, determina efeitos negativos significativos sobre o desenvolvimento de frangos de corte:
 - a. O desempenho das aves é afetado em todos os parâmetros avaliados (peso corporal, consumo de ração e conversão alimentar) e o efeito é dependente da dose de FB aplicada às aves, da mesma forma que o peso relativo do fígado.
 - b. Os parâmetros de bioquímica clínica afetados pela presença de FB na dieta das aves são proteínas plasmáticas totais, albumina, colesterol total, triglicerídeos, cálcio, fósforo, ácido úrico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase

e gama glutamiltransferase. Não são evidenciados efeitos significativos sobre a atividade da enzima fosfatase alcalina.

- c. A relação entre Esfinganina e Esfingosina séricas (SA:SO) é alterada pela intoxicação com FB e a elevação neste parâmetro é dependente da dose de FB utilizada.
 - d. Os órgãos afetados pela intoxicação por FB são fígado, rins e intestino delgado, comprovado pelas alterações nos parâmetros de bioquímica clínica e nos achados histológicos (para fígado e rins) e nas avaliações de morfologia intestinal (altura de vilosidades e relação vilosidade/cripta). Não há efeitos significativos da intoxicação por FB em outros órgãos avaliados (Bursa de Fabrício, timo, baço, coração, pâncreas e pulmões).
3. A interação entre a inoculação de sLPS e a intoxicação por FB em frangos de corte até os 28 dias de vida tem efeito significativo sobre o desenvolvimento destas aves:
- a. Os parâmetros de bioquímica clínica afetados pela interação entre o sLPS e a FB são albumina, colesterol total, fósforo e ácido úrico. Não há efeitos significativos da interação entre sLPS e FB sobre os demais parâmetros de bioquímica clínica avaliados
 - b. O efeito inflamatório da inoculação de sLPS nas aves é potencializado pela presença de FB na dieta, comprovado pelo efeito da interação entre sLPS e FB sobre os níveis de Proteína C-reativa.
 - c. Os órgãos afetados pela interação entre sLPS e FB são fígado e rins, comprovado pela potencialização dos efeitos sobre os parâmetros de bioquímica clínica e pelo aumento no peso relativo do fígado das aves.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo : Atheneu. 2008. p.7-19.
- BARTON, C. C.; HILL, D. A.; YEE, S. B.; BARTON, E. X.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Bacterial lipopolysaccharide exposure augments aflatoxin B1-induced liver injury. **Toxicological Sciences**. v. 55. p. 444-452. 2000.
- BATATINHA, M. J. M.; SIMAS, M. M. S; GÓRNIAK, S. L. Micotoxicoses. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 1 ed. Barueri: Manole, 2008. p. 479-509.
- BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Toxinas Bacterianas. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 1 ed. Barueri: Manole, 2008. p. 559-620.
- BOUHET, S.; HOURCADE, E.; LOISEAU, N.; FIKRY, A.; MARTINEZ, S.; ROSELLI, M.; GALTIER, P.; MENGHERI, E.; OSWALD, I. P.. The mycotoxin fumonisin B1 alters the preproliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicological Sciences**. v. 77. p. 165-171. 2004.
- BROOMHEAD, J. N.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E. Chronic effects of Fumonisins B1 in broilers and turkey fed dietary treatments to market age. **Poultry Science**. v. 81. n. 1. p. 56-61. 2002.
- BUYSE, J.; SWENNEN, Q.; NIEWOLD, T. A.; KLASING, K. C.; JANSSENS, G. P. J.; BAUMGARTNER, M.; GOOERIS, B. M. Dietary L-carnitine supplementation enhances the Lipopolysaccharide-induced acute phase protein response in broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 118. p. 154-159. 2007.
- CHAMANZA, R.; VEEN, L.; TIVAPASI, M. T.; TOUSSAINT, M. J. M. Acute phase proteins in the domestic fowl. **World's Poultry Science Journal**. v. 55. p. 61-71. 1999.
- DEL BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of Aflatoxin B₁ and Fumonisins B₁ in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 84. p. 1835-1840. 2005.
- DILKIN, P.; HASSEGAWA, R.; REIS, T. A.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**. v. 34. n. 1. p. 175-181. 2004.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; STEFANON, E. B.; FONTANA, F. Z.; MILBRADT, E. L. Production of fumonisins by strains of *Fusarium verticillioides* according to temperature, moisture and growth period. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33. p. 111-118. 2002.
- DRAGAN, Y. P.; BIDLACK, W. K.; COHEN, S. M.; GOLDSWORTHY, R. T.; VOSS, K. A. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk

assessment: fumonisina B₁ as an example. **Toxicological Sciences.** v. 61. n. 1. p. 6-17. 2001.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R.; CUADRADAS, C.; CABANES, F. J. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications. **Avian Diseases.** v. 41. n. 1. p. 73-79. 1997.

FERNANDES, F. C. Endotoxinas em aviários. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho.** v. 3. p. 22-28. 2005.

GAO, J.; ZHANG, H. J.; YU, S. H.; WU, S. G.; YOON, I.; QUIGLEY, J.; GAO, Y. P.; QI, G. H. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. **Poultry Science.** v. 87. p. 1377-1384. 2008.

GELDERBLOM, W. C.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. Fumonisins novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium verticilloides*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 54. p. 1806-1811. 1988.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Características gerais dos fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5 ed. São Paulo : Atheneu. 2008. p.479-491.

GUAIUME, E. A. Effects of continuous administration of low-dose of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in chicks and poult fed non toxic doses of aflatoxin B1 and T-2 toxin. **Tese**, University of Missouri, Columbia, Estados Unidos da América. 2005. 200 f.

HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology.** v. 31. n. 3. p. 140-151. 2002.

HARR, K. E. Diagnostic value of biochemistry. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical Avian Medicine.** v. 2. Palm Beach: Spix Publishing, 2006. p. 611-630.

HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREENE, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrotorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium verticilloides*. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation.** v. 2. p. 217-221. 1990.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D.; FLETCHER, O. J. The toxicity of purified Fumonisin B₁ in broiler chicks. **Poultry Science.** v. 79. p. 1378-1384. 2000.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine and Surgery: Principles and applications.** Lake North: Wingers Publishing, 1994. p. 223-245.

HOERR, F. J. Mycotoxicoses. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry.** 11 ed. Iowa : Iowa State Press, 2003. p. 1103-1132.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impacto f mycotoxins on human and animals. **Toxicology.** v. 167. p. 101-134. 2001.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBOECK, B.; SMITH, A.L.; GÖBEL, T. W. F. Avian innate immune responses. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. 1 ed. San Diego: Elsevier, 2008. p. 129-158.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, S. A.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E.; CASPER, H. H. Individual and combined effects of fumonisina B₁ present in *Fusarium verticilloides* culture material and T-2 toxin or Deoxynivalenol in broiler chicks. **Poultry Science**. v. 76. n. 9. p. 1239-1247. 1997.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; KAMPS-HOLTZAPPLE, C.; HARVEY, R. B.; ELISSALDE, M. H.; ROTTINGHAUS, G. E.. Effects of feeding Fumonisin B₁ present in *Fusarium verticilloides* culture material and Aflatoxin singly and in combination to turkey poult. **Poultry Science**. v. 74. p. 1295-1303. 1995.

LAMIC. Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Tabelas de resultados, 2012. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

LEDOUX, D. R.; BROWN, T. P.; WEIBKING, T. S.; ROTTINGHAUS, G. E.. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**. v. 4. p. 330-333. 1992.

LEESON, D. R.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995. 352 p.

LI Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCHE, K. L.; ROTTINGHAUS. G. E. Effects of Fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. **Poultry Science**. v. 78. p. 1275-1282. 1999.

LIEBERS, V.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BRÜNING, T. Health effects due to endotoxin inhalation (review). **Arch. Toxicol.** v. 82. p. 203-210. 2008.

LIESER, B.; LIEBISCH, G.; DROBNIK, W.; SCHMITZ, G.. Quantification of sphinganine and sphingosine from crude extracts by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**. v. 44. p. 2209-2216. 2003.

LUMEIJ, J. T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. San Diego: Elsevier, 2008. p. 839-872.

LUNA, G. C. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces**. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

LUYENDYK, J. P.; SHORES, K. C.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Bacterial lipopolysaccharide exposure alters aflatoxin B₁ hepatotoxicity: Benchmark dose analysis for markers of liver injury. **Toxicological Sciences**. v. 68. p. 220-225. 2002.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. 1 ed. Santa Maria: Ed. Do Autor, 2007. 240 p.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; RAUBER, R. H. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves.** 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 821-832.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; RAUBER, R. H.; GIACOMINI, L. Z. Mycotoxicosis in swine. In: GONÇALVEZ, E.; FELICIO, J. D.; AQUINO, S. **Mycotoxicoses in animals economically important.** 1 ed. New York: Nova Science Publishers. 2010. p. 67-95

MARASAS, W. F.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLOM, W. C.; COETZER, J. A.; THIEL, P. G.; VAN DER LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium verticillioides*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research.** v. 55. p. 197-203. 1988.

MARNELL, L.; MOLD, C.; DU CLOS, T. W. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical Immunology.** v. 117. p. 104-111. 2005.

MERRILL Jr., A. H.; SCHMELZ, E. M.; DILLEHAY, D. L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J. A.; SCHROEDER, J. J.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; WANG, E. Sphingolipids – The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 142. p. 208-225. 1997a.

MERRILL Jr., A. H.; SCHMELZ, E. M.; WANG, E.; DILLEHAY, D. L.; RICE, L. G.; MEREDITH, F.; RILEY, R. T. Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. **Journal of Nutrition.** v. 127. n. 5. p. 830-833. 1997b.

MERRILL Jr., A. H.; SULLARDS, C. M.; WANG E.; VOSS K. A.; RILEY, R. T. Sphingolipids metabolism: roles in signals transduction and disruption by fumonisins. **Environm. Health Perspect.** v. 109. n. 2. p. 283-289. 2001.

MIAZZO R.; PERALTA M. F.; MAGNOLI C.; SALVANO M.; FERRERO S.; CHIACCHIERA S. M.; CARVALHO E. C. Q.; ROSA C. A. R.; DALCEROL A. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. **Poultry Science.** V.84. n. 1. p. 1-8. 2005.

MONBALIU, S.; VAN POUCKE, C.; DETAVERNIER, C.; DUMOULIN, F.; VAN DE VELDE, M.; SCHOETERS, E.; VAN DYCK, S.; AVERKIEVA, O.; VAN PETEGHEM, C.; DE SAEGER, S. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **J. Agric. Food Chem.** v. 58. p. 66-71. 2010.

MUELLER, M.; LINDNER, B.; KUSUMOTO, S.; FUKASE, K.; SCHROMM, A. B.; SEYDEL, U. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 279. p. 26307-26313. 2004.

NRC. **Nutrient Requirement of Poultry.** 9 ed. Washington: National Academic Press, 1994.

OLIVEIRA, C. A. F.; GONÇALVEZ, E.; REDDY, K. R. N. Mycotoxicosis in domestic fowl. In: GONÇALVEZ, E.; FELICIO, J. D.; AQUINO, S. **Mycotoxicoses in animals economically important.** 1 ed. New York: Nova Science Publishers. 2010. p. 97-115.

- PIAZZA, R. M. F.; MENEZES, C. A.; SONOBE, M. H. Fatores de Virulência II: Toxinas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Micorbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 149-156.
- RAMASAMY, S.; WANG, E.; HENNING, B.; MERRIL JR, A. H. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. **Toxicological and Applied Pharmacology**. v. 133. p. 343-348. 1995.
- ROEDER, D. J.; LEI, M.; MORRISON, D. C. Endotoxic-Lipopolysaccharide-Specific binding protein on lymphoid cells of various animal species: association with endotoxin susceptibility. **Infection and Immunity**. v. 57. p. 1054-1058. 1989.
- ROTH, R. A.; HARKEMA, J. R.; PESTKA, J. P.; GANEY, P. E. Is exposure to Bacterial Endotoxin a Determinant of Susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 147. p. 300-311. 1997.
- SCHIERL, R.; HEISE, A.; EGGER, U.; SCHNEIDER, F.; EICHELSE, R.; NESER, S.; NOWAK, D. Endotoxin concentration in modern animal houses in southern Bavaria. **Ann. Agric. Environ. Med.** v. 14. p. 129-136. 2007.
- SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W. L. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 149. p. 324-333. 2008.
- TAKAHASHI, K.; YODOGAWA, S.; AKIBA, Y. Effect of dietary protein concentration on responses to *Escherichia coli* Endotoxin in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**. v. 74. p. 173-182. 1995.
- THOMPSON, K. L.; APPLEGATE, T. J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poultry Science**. v. 85. p. 1535-1540. 2006.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587 p.
- TRAN, S. T.; BAILLY, J. D.; TARDIEU, D.; DURAN, S.; BERNARD, G.; GUERRE, P. Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks. **Chemico-Biological Interactions**. v. 146. p. 61-72. 2003.
- TUIN, A. Detoxification of LPS by alkaline phosphatase: application of a new concept in sepsis and inflammatory bowel disease. **Tese**, University of Groningen, Groningen, Holanda. 2007. 192 f.
- UBABEF. Relatórios Anuais 2005 a 2011. Disponível em <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php> Acessado em 05 de maio de 2012.
- UENO, Y.; IIJIMA, K.; WANG, S. D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S. Z. Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**. v. 35. p. 1143-1150. 1997.

VOSS, K. A.; SMITH, G. W.; HASCHEK, W. M. Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action ant toxicity. **Animal Feed Science and Technology.** v. 137. p. 299-325. 2007.

VUCEMILLO, M.; MATKOVIC, K.; VINKOVIC, B.; MACAN, J.; VARNAI, V. M.; PRESTER, L.; GRANIC, K.; ORCT, T. Effect of microclimate on the airbone dust and endotoxin concentration in a broiler house. **Czech Journal of Animal Science.** v. 53. n. 2. p. 83-89. 2008.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL Jr., A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium verticilloides*. **J. Biol. Chem.** v. 266. n. 22. p. 14486-14490. 1991.

XIE, H.; RATH, N. C.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Effects of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide on broiler chickens. **Poultry Science.** v. 79. p. 33-40. 2000.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Comprovante de submissão de artigo científico SA 677 2012 ao periódico Brazilian Journal of Poultry Science, em 15 de junho de 2012.



Ricardo Hummes Rauber <rauber.vet@gmail.com>

Recebimento de artigo SA 677 2012

BJPS - FACTA <revista@facta.org.br>
Responder a: revista@facta.org.br
Para: rauber.vet@gmail.com

15 de junho de 2012 11:55

Prezado Ricardo,

É com prazer que acusamos o recebimento do seu trabalho. Ele foi cadastrado e será encaminhado para as revisões.

Abaixo, seguem os dados e o código do trabalho.

Sempre que quiser verificar seu andamento ou obter informações sobre ele, consulte-nos utilizando o número especificado.

Código do trabalho: SA 677 2012

Título: Interference of *Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide on performance and biological parameters of broiler chickens

Atenciosamente,

Koralina Moura

ANEXO 2. Comprovante de submissão de artigo científico CAVP-2012-0116 ao periódico Avian Pathology, em 14 de agosto de 2012.



Ricardo Hummes Rauber <rauber.vet@gmail.com>

Avian Pathology - Manuscript ID CAVP-2012-0116

avp@cavanagh1000.plus.com <avp@cavanagh1000.plus.com>
Para: rauber.vet@gmail.com

14 de agosto de 2012 16:53

The 2010 (published in 2011) Impact Factor for Avian Pathology is 1.967, which places it 16h out of 145 journals in the Veterinary Sciences category. Avian Pathology has the highest Article Influence Score™ of journals devoted to avian species and is ranked 15/145 in Veterinary Sciences. Royalties from the sale of Avian Pathology are used by the Houghton Trust to provide International Travel Grants for young scientists. For more information go to <http://www.houghtontrust.org.uk/travelgrants.shtml>

14-Aug-2012

Dear Dr. Rauber:

Your manuscript entitled "EFFECTS OF FUMONISIN B1 ON SELECTED PATHOLOGICAL RESPONSES AND PERFORMANCE OF BROILER CHICKENS" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Avian Pathology.

Your manuscript ID is CAVP-2012-0116.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/cavp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/cavp>.

Thank you for submitting your manuscript to Avian Pathology.

Sincerely,
Avian Pathology Editorial Office

Royalties from the sale of Avian Pathology are used by the Houghton Trust to provide International Travel Grants for young scientists. For more information go to <http://www.houghtontrust.org.uk/travelgrants.shtml>

ANEXO 3. Comprovante de submissão de artigo científico PS-12-02489 ao periódico Poultry Science, em 21 de maio de 2012.



Ricardo Hummes Rauber <rauber.vet@gmail.com>

Manuscript Submitted to Poultry Science - Submission Form Needed

jennig@assochq.org <jennig@assochq.org>
Para: rauber.vet@gmail.com

21 de maio de 2012 15:22

21-May-2012

Dear Mr. Rauber:

The manuscript you submitted to Poultry Science, "Individual and combined effects of *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide and Fumonisin B1 in broiler chickens," has been successfully uploaded to Manuscript Central. We appreciate your consideration of our journal to publish your research.

The corresponding author will receive future communications via e-mail.

Your manuscript ID is PS-12-02489. Please mention this ID in all future correspondence or when calling the office with questions. You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging on to <http://mc04.manuscriptcentral.com/ps>.

Be sure to save your word processing and graphics files from your manuscript. You will need them if you are asked to revise your manuscript.

We also need a copyright release form signed by all authors; if authors are at different locations, more than one form may be used and submitted separately. Please fax (217-378-4083) or mail (PSA Editorial Office, 1800 South Oak, Suite 100, Champaign, IL 61820) the form to our office. For your convenience, a form (in .pdf format) has been attached to this e-mail. The form is also available online when you click "Instructions and Forms" in the upper-right corner of the submission site.

Again, thank you your interest in Poultry Science.

Sincerely,

Prof. Tom Porter
Poultry Science

ANEXO 4. Comprovante de aceite do artigo científico PS-12-02489 no periódico Poultry Science, em 12 de agosto de 2012.



Ricardo Hummes Rauber <rauber.vet@gmail.com>

Poultry Science - PS-12-02489.R1

PS-Editor@umd.edu <PS-Editor@umd.edu>
Para: rauber.vet@gmail.com

12 de agosto de 2012 12:00

12-Aug-2012

Dear Mr. Rauber:

The Editorial Board of Poultry Science is pleased to announce that your manuscript PS-12-02489.R1 "Individual and combined effects of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide and Fumonisins B1 in broiler chickens" has been accepted for publication in the journal.

Your paper has been forwarded to the Editorial Office for processing. You should receive author proofs for your final review within approximately 3 months. If you have any questions, please contact the editorial office (journals@assochq.org).

Note that a copyright form signed by all authors must be on file at the editorial office before your paper can be published. If you have not already done so, please complete the attached form and fax ([217-378-4083](tel:217-378-4083)) or scan and e-mail (journals@assochq.org) it to them.

On behalf of the Editors of Poultry Science, we look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,
Prof. Tom E. Porter
Editor-in-Chief, Poultry Science
PS-Editor@umd.edu
