

# ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CARDÍACAS EM CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix japonica*) INTOXICADAS EXPERIMENTALMENTE COM DOSE SUB-LETAL DE AFLATOXINA\*

## HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN CARDIAC JAPANESE QUAILS (*Coturnix japonica*) EXPERIMENTALLY INTOXICATED WITH SUB-LETHAL DOSE OF AFLATOXIN

Sergian Vianna Cardozo<sup>1</sup>, Tatiana Silveira Feijó Cardozo<sup>2</sup>, Walter Leira Teixeira Filho<sup>3</sup> Ana Maria Reis Ferreira<sup>4</sup> e Carlos Wilson Gomes Lopes<sup>5</sup>

**ABSTRACT.** Cardozo S.V., Cardozo T.S.F., Teixeira Filho W.L. Ferreira, A.M.R. & Lopes C.W.G. [**Histopathological changes in cardiac Japanese quails (*Coturnix japonica*) experimentally intoxicated with sub-lethal dose of aflatoxin.**] Alterações histopatológicas cardíacas em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) intoxicadas experimentalmente com dose subletal de aflatoxina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 33(4):210-214, 2011. Escola de Ciências da Saúde, Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: sergianvc@gmail.com

The aim of this study was to identify and describe the histopathological lesions in cardiac Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimentally intoxicated with sub-lethal dose of aflatoxin. A total of 40 birds was taken directly from the incubator after birth and taken to the lab, and kept in two metal cages, according to the experimental group and properly heated using incandescent bulbs until the end of the experiment. On the 7th day after birth 20 birds were poisoned orally by gavage technique with aflatoxin at a dose of 0.04 mg / kg body weight (Group I) and the remaining animals were kept free of mycotoxin poisoning (Group control). On days 6, 11, 18 and 25 after intoxication (DAI), twenty birds were euthanized and necropsied at a time, five of each group. The thoracic cavity was opened and inspected the demand for gross lesions in the heart and then this body was collected in 10% buffered formalin for processing and optical microscopy study. Only in group I observed was the presence of areas of vacuolar degeneration, and interstitial edema, when compared with samples from the control group. Cardiomyocyte nuclei were pyknotic and showed granular chromatin. These findings were only observed from 11 DAI, and related to the process of poisoning of birds by aflatoxin.

**KEY WORDS.** Aflatoxin, Japanese quail, cardiomyocytes, poisoning.

**RESUMO.** O objetivo deste estudo foi identificar e descrever as lesões histopatológicas cardíacas em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) into-

xicadas experimentalmente com dose sub-letal de aflatoxina. Um total de 40 aves foi retirado diretamente da incubadora após o nascimento e levado

\*Recebido em 28 de janeiro de 2011.

Aceito para publicação em 23 de março de 2011.

<sup>1</sup>Médico-veterinário. *Dr. Pathol.* Escola de Ciências da Saúde, Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: sergianvc@gmail.com

<sup>2</sup>Nutricionista. *D.CsTecnol.Alim.* Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (HVPTPOA), Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: tatiana.cardozo@ymail.com

<sup>3</sup>Biólogo. *PhD.* Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: leira@ufrj.br

<sup>4</sup>Médica-veterinária, *Dr. Patol.* Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, FV, UFF, Rua Vital Brazil, 64, Niterói, RJ 24320-340. E-mail: anaferreira@pq.cnpq.br - bolsista CNPq.

<sup>5</sup>Médico-veterinário. *PhD*, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: lopescw@ufrj.br - bolsista CNPq.

para o laboratório, sendo mantidas em duas gaiolas de metal, de acordo com o grupo experimental e devidamente aquecido utilizando-se lâmpadas incandescentes, até o final do experimento. No 7º dia após o nascimento 20 aves foram intoxicadas por via oral, pela técnica de gavagem, com aflatoxina na dose de 0,04 mg/kg de peso vivo (Grupo I) e os demais animais foram mantidos livres de intoxicação por micotoxinas (Grupo controle). Nos dias 6, 11, 18 e 25 após a intoxicação, vinte aves foram eutanasiadas e necropsiadas por vez, sendo cinco de cada grupo. A cavidade torácica foi aberta e inspecionada a procura de lesões macroscópicas no coração e em seguida este órgão foi coletado em formol tamponado a 10% para processamento e estudo em microscopia óptica. Apenas nos animais do grupo I foi observada a presença de áreas de degeneração vacuolar, além de edema intersticial, quando comparadas com as amostras do grupo controle. Os núcleos dos cardiomiócitos se apresentaram picnóticos e com cromatina granular. Tais achados só foram observados a partir do 11º DAI, sendo relacionados ao processo de intoxicação das aves pela aflatoxina.

**PALAVRAS-CHAVE.** Aflatoxina, Codorna japonesa, cardiomiócitos, intoxicação.

## INTRODUÇÃO

A presença das aflatoxinas nos alimentos e rações tem sido objeto de grande preocupação no mundo científico, desde a sua descoberta. As aflatoxinas são conhecidas por serem substâncias tóxicas, mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas e são apontadas como agentes causadores de alterações hepáticas em animais (Cardozo et al. 2009) e no homem, além das perdas econômicas que causam na agricultura (Rustom 1997).

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente com as espécies, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (Kurtzman et al. 1987). A incidência de aflatoxinas é relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde a temperatura e a umidade são favoráveis para o crescimento dos fungos.

Apesar das maiores concentrações de aflatoxinas serem encontradas em grãos que estão mal armazenados em ambientes quentes e úmidos, também é possível detectar concentrações significantes de aflatoxinas no campo, antes da colheita. O milho e o amendoim continuam sendo as maiores fontes de aflatoxinas principalmente na Índia e América

do Sul, porém outros cereais produzidos em clima tropical, bem como seus subprodutos também são susceptíveis à contaminação por aflatoxinas (Hussein & Brasel 2001).

As codornas japonesas têm elevada sensibilidade às aflatoxinas, conforme se observa pelos resultados de alguns estudos de toxicidade aguda efetuados em codornas de postura (Chang & Hamilton 1982). Contudo, os estudos sobre os efeitos de baixas concentrações de aflatoxinas em codornas japonesas são escassos na literatura.

O objetivo do presente estudo foi identificar e descrever as lesões cardíacas em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) intoxicadas experimentalmente com dose subletal de aflatoxina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de experimentação e origem dos animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Coccídios e Coccidioses - Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Laboratório de Microscopia da Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO).

As codornas japonesas foram originadas de uma criação situada na zona rural da localidade de São Miguel, Município de Seropédica, RJ

### Origem e obtenção do inóculo de aflatoxina

A aflatoxina utilizada na intoxicação dos animais foi produzida a partir do cultivo da cepa toxigênica NRRL 2999 de *A. parasiticus* em substrato sólido de arroz, obtida da coleção do Northern Regional Research Center, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, EUA e cedida ao Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, pelo Dr. C.W. Hesseltine. O cultivo de arroz foi submetido à extração com clorofórmio, após crescimento a temperatura de 28°C, durante 21 dias, sendo o filtrado obtido, evaporado em rotavapor sob vácuo e temperatura de 55°C (Shottwell et al. 1966). Para determinação da presença da aflatoxina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a quantificação da toxina foi obtida através de detector UV-VIS, com uso de padrão externo para comparação dos resultados das áreas de pico dos cromatogramas. O extrato final seco contendo 2,65 mg de aflatoxina foi ressuscitado em 60 ml de óleo de milho, para administração oral nas aves.

## Delimitação experimental e necropsia

Um total de 40 aves foi retirado diretamente da incubadora após o nascimento e levado para o laboratório, sendo as aves mantidas em duas gaiolas de metal, de acordo com o grupo experimental. As aves foram devidamente aquecidas utilizando-se lâmpadas incandescentes, até o final do experimento. No 7º dia após o nascimento, 20 aves foram intoxicadas por via oral, pela técnica de gavagem, com aflatoxina na dose de 0,04 mg/kg de peso vivo (Grupo I) e os demais animais foram mantidos livres de intoxicação por micotoxinas (Grupo controle). Ração e água foram oferecidos *ad libitum*. A ração convencional foi composta a base de milho e farelo de soja, isenta de micotoxinas e balanceada, de modo a atender as exigências nutricionais de codornas poedeiras em fase inicial de crescimento.

Nos dias 6, 11, 18 e 25 após a intoxicação (DAI), vinte aves foram eutanasiadas, de acordo com a resolução número 714, de 20 de junho de 2002 (CRMV-RJ, 2011), e necropsiadas por vez, sendo cinco de cada grupo. A cavidade torácica foi aberta e inspecionada a procura de lesões macroscópicas no coração e em seguida este órgão foi coletado em formol tamponado a 10% (Prophet et al. 1994) para processamento e estudo em microscopia óptica. As amostras de tecido cardíaco foram clivadas em fragmentos menores com 2 a 4 mm de espessura, identificadas e processadas para coloração de rotina histológica pela hematoxilina e eosina (H&E) (Allen 1994).

As aves do grupo controle passaram pelos mesmos procedimentos adotados para intoxicação por aflatoxina utilizados nos animais do grupo I.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas nos animais do grupo I foi observado a presença de áreas de degeneração, principalmente, próxima as válvulas átrio-ventriculares, compatíveis com o processo patológico de degeneração vacuolar (Figura 1A,B), além de edema intersticial (Figura 2), caracterizado pela visualização das fibras musculares cardíacas mais frouxas e menos coradas, quando comparadas com as amostras do grupo controle (Figura 3A,B). Os núcleos dos cardiomiócitos, em determinadas regiões, se apresentaram picnóticos e com cromatina granular. Tais achados só foram observados a partir do 11º DAI, sendo relacionados ao processo de intoxicação das aves pela aflatoxina.

Cruz (1995) refere-se às alterações causadas pelas aflatoxinas de acordo com o sistema orgâni-

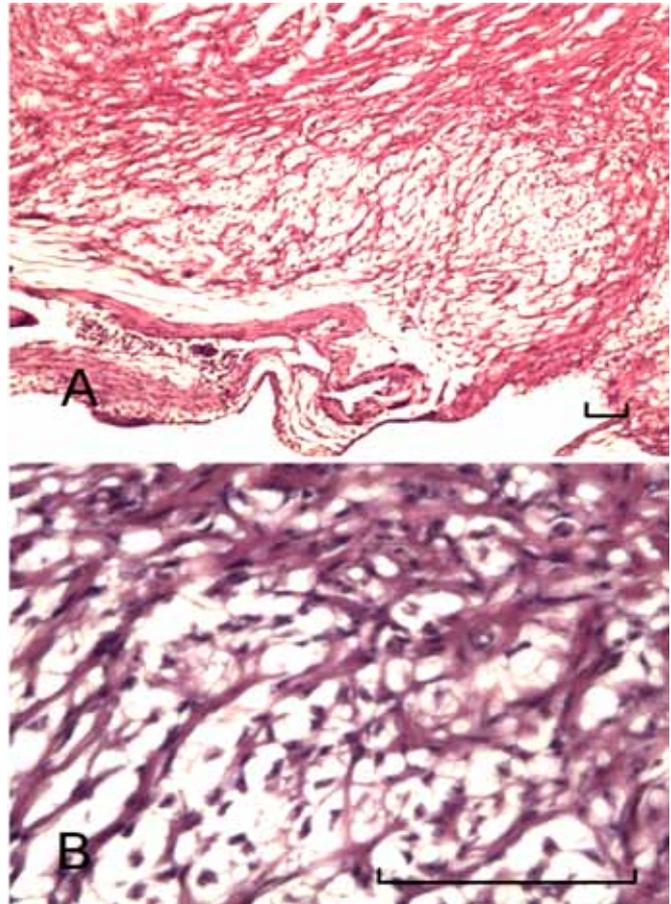


Figura 1. Coração de uma codorna do grupo II obtida no 11º dia após a intoxicação. A) Presença de vacúolos intracitoplasmáticos nos cardiomiócitos (escala=25µm). B) Visão em detalhe de A. H.E. (escala=50µm)

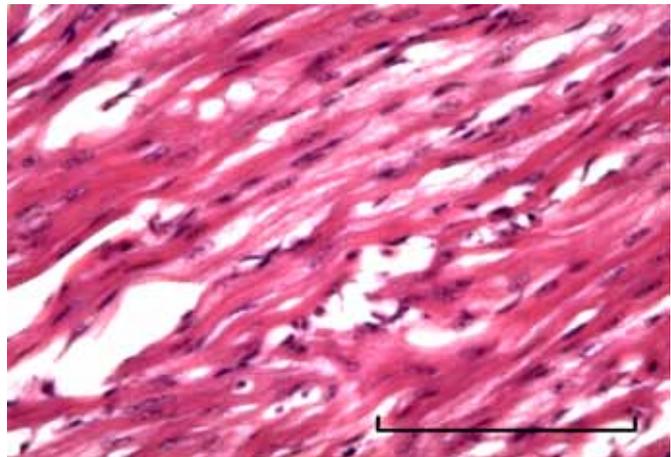


Figura 2. Coração de uma codorna do grupo II obtida no 11º dia após a intoxicação. Edema intersticial. H.E. (escala=50µm)

co afetado. No sistema gastrointestinal, podem ser observadas alterações como diarreia e hemorragia intestinal, atrofia das vilosidades, necrose e fibrose. No sistema cutâneo observa-se icterícia, consequente a desordem hepática. No sistema imune é observada redução da atividade imunológica, seja pela diminuição da atividade do complemento e da

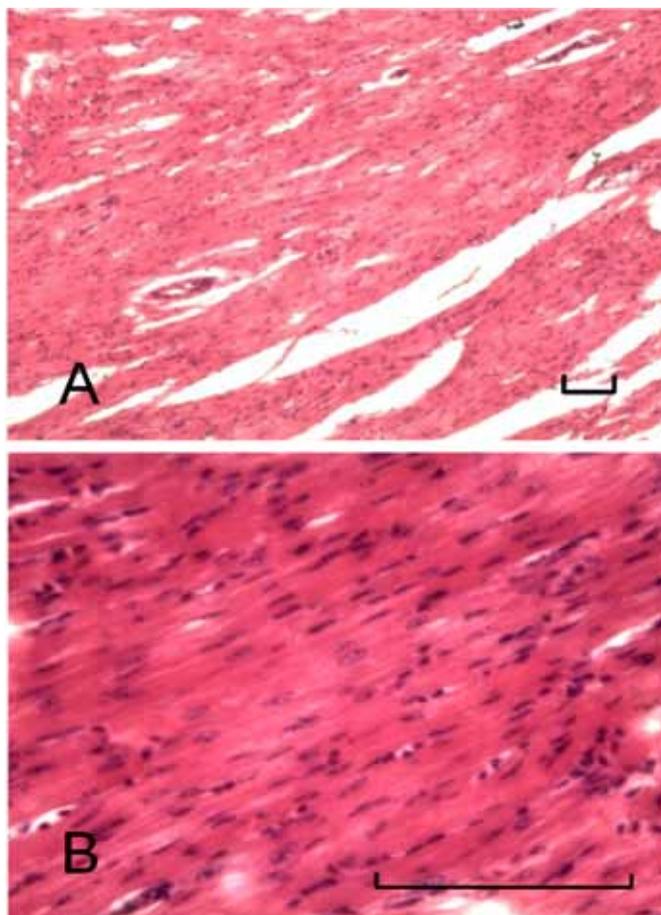


Figura 3. Coração de uma codorna do grupo controle obtida no 11º dia após a intoxicação. A) Fibras musculares cardíacas íntegras (escala=25µm). B) Visão em detalhe de A. H.E. (escala=50µm)

quantidade de imunoglobulinas e pelo decréscimo da atividade linfocitária e fagocitária, além do efeito imunossupressor sobre o timo, bursa cloacal e baço. No sistema cardiovascular, a aflatoxicose leva a fragilidade vascular com consequente ocorrência de hemorragias nos mais diversos órgãos. Tais alterações descritas acima não foram observadas no presente estudo devido à administração de aflatoxina nas aves ter sido realizada de forma subletal, favorecendo uma minimização das alterações orgânicas.

Poucos são os relatos na literatura relacionados com as alterações histopatológicas observadas no coração de aves intoxicadas com aflatoxina. Kibugu et al. (2009) ao estudar a associação entre a infecção experimental por *Trypanosoma brucei rhodesiense* e a aflatoxicose em ratos de laboratório, demonstraram que os animais intoxicados e infectados tiveram lesões cardíacas mais graves que os demais. Essas lesões foram caracterizadas por infiltração de células inflamatórias, processos degenerativos celulares, assim como, necrose e fibrose do miocárdio.

Hussain et al. (2008) observaram a presença de alterações hemorrágicas em frangos em fase inicial de crescimento intoxicados de forma aguda com aflatoxina.

Segundo Eraslan et al. (2004) codornas intoxicadas com aflatoxinas, isoladamente ou em combinação com um adsorvente apresentaram uma diminuição significativa na atividade da enzima creatina quinase, além de degeneração dos cardiomiócitos e hiperemia. Estes resultados foram semelhantes aos observados no presente estudo e contradizem os descritos por Rauber et al. (2007) que relatam a ausência de alterações histopatológicas cardíacas em aves intoxicadas com diferentes doses de aflatoxinas.

### CONCLUSÃO

A intoxicação aguda por aflatoxina em dose subletal é responsável por alterações cardíacas microscópicas em codornas japonesas na fase inicial de crescimento, sendo um fator em potencial que pode influenciar ao longo da vida produtiva desses animais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen T.C. Hematoxylin and Eosin, p.53-58. In: Prophet E.B., Mills, B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (Eds), *Laboratory Methods in Histotechnology*, Washington, American Registry of Pathology, 1994.
- Cardozo S.V., Teixeira Filho W.L., Kruger C.D., Rosa C.A.R., Ferreira A.M.R., Macedo H.W. & Lopes C.W.G. Alterações hepáticas na aflatoxicose experimental em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em fase inicial de crescimento. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 30:210-214, 2008.
- Chang C.F. & Hamilton P.B. Experimental aflatoxicosis in young Japanese quail. *Poult. Sci.*, 61:869-874, 1982.
- Chu F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutat. Res.*, 259:291-306, 1991.
- CRMV-RJ. Resoluções. Online. Disponível em: <<http://www.crmvrj.com.br/legisla/texto/res714.htm>> Acesso em: 25 Jan. 2011.
- Cruz L.C.H. da. Características gerais das micotoxinas e micotoxicosis. Reflexos na indústria avícola. *Anais Simp. Int. Micotox. Micotoxic. Aves*, Curitiba, 1995, p.1-13.
- Eraslan G., Liman B.C., Guclu B.K., Atasever A., Koc A.N. & Beyaz L. Evaluation of aflatoxin toxicity in Japanese quails given various doses of hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 48:511-517, 2004.
- Hussain Z., Khan M.Z. & Hassan Z. Production of aflatoxins from *Aspergillus flavus* and acute aflatoxicosis in young broiler chicks. *Pak. J. Agri. Sci.*, 45:95-102, 2008.

- Hussein H.S. & Brasel J.M. Review: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167:101-134, 2001.
- Kibugu J.K., Makumi J.N., Ngeranwa J.J.N., Kagira J.M., Gathumbi J.K. & Mwangi J.N. Aggravation of pathogenesis mediated by aflatoxin B1 in mice infected with *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *J. Protozool. Res.*, 19:24-33, 2009.
- Kurtzman C.P., Horn B.W. & Hesseltine C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Ant. Leeuwenhoek*, 53:147-158, 1987.
- Prophet E.B. Faxation, p.25-28. In: Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (Eds), *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Patology, Washington, 1994.
- Rauber R.H., Dilkin P., Giacomini L.Z., Araújo de Almeida C.A. & Mallmann C.A. Performance of Turkey Poults Fed Different Doses of Aflatoxins in the Diet. *Poult. Sci.*, 86:1620-1624, 2007.
- Rustom I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods. *Food Chem.*, 59:57-67, 1997.
- Shotwell O.L., Hesseltine C.W., Stubblefield R.D. & Sorenson W.G. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.*, 14:425-428, 1966.