

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

AFLATOXICOSE EM BOVINOS

TESE DE DOUTORADO

Felipe Pierezan

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

AFLATOXICOSE EM BOVINOS

Felipe Pierezan

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Veterinária, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a
obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Claudio Severo Lombardo de Barros

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pierezan, Felipe
Aflatoxicose em bovinos / Felipe Pierezan.-2013.
59 f.; 30cm

Orientador: Claudio Severo Lombardo de Barros
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. Doenças de bovinos 2. Micotoxicose 3. Aflatoxicose
4. Doenças hepáticas 5. Patologia I. Severo Lombardo de
Barros, Claudio II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

AFLATOXICOSE EM BOVINOS

elaborada por
Felipe Pierezan

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD
(Presidente/Orientador)

Ana Lucia Pereira Schild, Dra. (UFPel)

Tatiana Mello de Souza, Dra. (UFSM)

David Driemeier, Dr. (UFRGS)

Rafael Fighera, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 18 de fevereiro de 2013.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

AFLATOXICOSE EM BOVINOS

AUTOR: FELIPE PIEREZAN

ORIENTADOR: CLAUDIO SEVERO LOMBARDO DE BARROS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de fevereiro de 2013.

Na primeira parte dessa tese, relatamos a ocorrência de um surto de aflatoxicose crônica em bezerros de raça leiteira. Quarenta bezerros holandeses, machos, de quatro meses de idade e aproximadamente 100 kg eram alimentados com feno de alfafa, milho quebrado e substituto de leite. Seis bezerros (15%) morreram após apresentar uma doença caracterizada por mau desenvolvimento geral, diarreia, pelagem áspera, dor abdominal, tenesmo, prolapso de reto e bruxismo. A duração do curso clínico foi de 2-3 dias; muitos terneiros desse lote que não morreram permaneceram pouco desenvolvidos. Os achados de necropsia de três bezerros incluíam fígado firme e castanho-claro, marcados hidrotórax e ascite, e edema do mesentério, mesocólon e das dobras da mucosa do abomaso. Os principais achados histopatológicos estavam restritos ao fígado e consistiam de fibrose, moderada megalocitose, hiperplasia de ductos biliares e lesão veno-oclusiva. A análise do milho do alimento dos bezerros por cromatografia de camada delgada revelou 5.136 ppb de aflatoxina B1 (AFB1). O diagnóstico de aflatoxicose foi feito baseado nos sinais clínicos e patologia característicos, na ausência de *Senecio* spp. na alimentação dos terneiros e na presença de altos níveis de aflatoxina no milho da alimentação dos bezerros. Na segunda parte da tese, dois experimentos foram realizados para determinar os efeitos tóxicos de diferentes doses de aflatoxinas em bezerros, considerando-se aspectos clínicos, produtivos e patológicos. No primeiro, nove bezerros, Holandês, com 2-4 meses de idade, receberam ração contendo 500 ± 100 ppb de aflatoxina, na quantidade equivalente a 1,5% do peso vivo/dia, durante dois meses. Três bezerros foram usados como controle. No segundo experimento, três bezerros, Holandês, com 4-5 meses de idade, receberam, por via oral, pequenas porções diárias de um concentrado de aflatoxinas, diluídas em 500 ml de água, correspondendo a doses de 1.250, 2.500 e 5.000 ppb de AFB1. Um bezerro foi usado como controle. No primeiro experimento, o ganho de peso dos bezerros recebendo AFB1 foi equivalente ao do grupo controle durante todo período experimental e não foram observadas alterações na atividade sérica da enzima aspartato transaminase (AST), da albumina sérica (AS), da proteína total (PT) e no hematócrito, quando comparados os resultados semanais do grupo tratamento e controle. Diferenças significativas nas atividades séricas das enzimas fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT) ocorreram na coleta do 63º dia do experimento. Não foram observados sinais clínicos e alterações histopatológicas de aflatoxicose em qualquer dos bezerros do grupo tratamento desse experimento. No segundo experimento, sinais clínicos observados nos bezerros intoxicados incluíram perda de apetite, diminuição do ganho de peso e emagrecimento. Icterícia, diarreia intermitente, tenesmo e apatia severa, foram observadas apenas em um bezerro (5.000 ppb de AFB1). Níveis alterados da atividade sérica de FA e GGT foram observados em todos os bezerros do grupo tratamento. Não foram observadas variações no hematócrito e na atividade sérica de AST, nem nos níveis séricos de PT, bilirrubina total e bilirrubina direta em qualquer dos bezerros desse experimento. Alterações histopatológicas nos bezerros intoxicados incluíram proliferação de ductos biliares, degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios, fibrose periportal, ou em ponte, megalocitose, fibrose subendotelial das veias hepáticas terminais e edema. Achados de necropsia do bezerro recebendo a maior dose de AFB1 incluíram fígado levemente aumentado de tamanho, difusamente amarelo-claro e firme, discreta ascite, edema de mesentério e submucosa do abomaso.

Palavras chave: Doenças de bovinos. Micotoxicose. Aflatoxicose. Doenças hepáticas. Patologia.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

AFLATOXICOSIS IN CATTLE

AUTHOR: FELIPE PIEREZAN

ADVISER: CLAUDIO SEVERO LOMBARDO DE BARROS

Santa Maria, February 18th, 2013.

In the first part of the thesis, the spontaneous occurrence of an outbreak of chronic aflatoxicosis is reported in dairy calves. Forty 4-month-old male Holstein calves of approximately 100kg were fed a ration constituted by alfalfa hay, broken corn and milk substitute. Six calves (15%) died after presenting a disease characterized by general unthriftiness, diarrhea, rough hair coats, abdominal pain, prolapsed rectum and grinding of teeth. The clinical course, was 2-3 days; however many calves in this lot that did not die, remained underdeveloped. Three calves were necropsied. Necropsy findings included firm, light tan livers and marked hydrothorax, ascites and edema of the mesentery, mesocolon and of the mucosal folds of the abomasum. Main histopathological changes were restricted to the liver and consisted of fibrosis, moderate megalocytosis, biliary duct hyperplasia and venoocclusive disease. The analysis by thin layer chromatography of the corn fed to calves revealed 5,136 ppb of aflatoxin B1. A diagnosis of aflatoxicosis was made based on the characteristic clinical signs and pathology, on the absence of *Senecio* spp. in the food and on the presence of high levels of aflatoxin in the corn fed to the calves. In the second part of the thesis, two experiments were performed in order to determine the toxic effects of varying doses of aflatoxins in calves. Clinical, productive and pathologic aspects of affected calves were considered. In the first experiment, nine 2-4-month old calves Holstein Friesian calves were fed, for two months, daily amounts corresponding to 1.5% of their body weight of a ration containing 500±100 ppb of aflatoxins. Three calves were used as controls. In the second experiment, three 4-5-month old Holstein Friesian calves, were orally fed daily small parcels of a concentrate of aflatoxins diluted in 500 ml of water corresponding to 1,250, 2,500 e 5,000 ppb of B1 aflatoxin (AFB1). A male calf was used as control. During all the experimental period of the first experiment, the weight gain of the calves receiving AFB1 was equivalent to that of the control group and no differences were observed between treated and control calves when the values of serum activity of aspartate transaminase (AST), serum albumin (SA), total serum protein (TP), and PVC, determined weekly, were compared. A significant difference in the serum activities of alkaline phosphatase (AP) and gamma glutamyl transferase when the serum sampled on the 63th day of the experiment was considered. During the whole experimental period and up to three weeks after the final of the experiment, no clinical signs or histopathological changes associated with the consumption of aflatoxins were observed in any of the calves of the first experiment. In the second experiment, clinical signs observed in three treated calves included loss of appetite, decrease in weight gain, and loss of weight Jaundice, intermittent diarrhea, tenesmus and apathy were only observed in the calf receiving 5,000 ppb of AFB1. Increased activity of AF and GGT were observed in all the calves of the treated group. No changes were observed regarding PCV, TP, total bilirubin, direct bilirubin and in the serum activity of AST in any of the calves of the second experiment. Histopathological changes in intoxicated calves included bile duct proliferation, cytoplasmic vacuolar hepatocellular degeneration consistent with hepatocellular deposit of lipids, periportal to bridging fibrosis, megalocytosis, subendothelial edema and fibrosis in terminal hepatic veins. Necropsy findings in the euthanatized calf which receive de largest doses of AFB1 included slight enlargement of the liver which was firm and diffusely light-yellow, mild ascites, and edema of the mesentery and of abomasal folds.

Key words: Diseases of cattle. Mycotoxicosis. Aflatoxicosis. Hepatic diseases. Pathology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas das principais aflatoxinas.....	14
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das principais aflatoxinas	13
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Aspectos históricos	10
2.2 Características físicas e químicas das aflatoxinas	12
2.3 Fungos produtores e ocorrência natural.....	15
2.4 Biotransformação das aflatoxinas.....	17
2.5 Epidemiologia da aflatoxicose em bovinos	18
2.6 Sinais clínicos.....	22
2.7 Achados de necropsia	23
2.8 Diagnóstico e métodos de detecção de aflatoxinas	25
2.9 Diagnóstico diferencial	26
2.10 Métodos de controle e tratamento	26
3 ARTIGO 1	29
3 ARTIGO 2	35
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES.....	51
7 REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Aflatoxicose é uma doença hepática aguda, subaguda ou crônica de humanos e animais, causada por aflatoxinas, metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Esses fungos ubíquos e saprofíticos crescem em uma ampla variedade de grãos, rações para animais e alimentos para consumo humano, como amendoim, milho, algodão, sorgo, girassol, arroz e nozes. As quatro principais aflatoxinas são B1, B2, G1 e G2 e; dessas, a aflatoxina B1 é a mais comum e a mais tóxica (KELLERMAN et al., 2005).

A doença já foi documentada em humanos, primatas não humanos, gatos, cães, roedores, aves, bovinos e búfalos pela ingestão de alimento contendo aflatoxina (HUSSEIN; BRASEL, 2001, KELLERMAN et al., 2005). A toxicidade das aflatoxinas varia dependendo da espécie animal considerada. Ruminantes estão entre os mais resistentes, uma vez que aflatoxinas são parcialmente degradados pela microbiota ruminal (HUSSEIN; BRASEL, 2001, YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). Bovinos são classificados como medianamente sensíveis e ovinos como resistentes a aflatoxinas (SCHOENTAL, 1967; KELLERMAN et al., 2005).

Surtos documentados de aflatoxicose em bovinos são raros. Nessa espécie, a doença geralmente não é tão fulminante quanto em suínos e segue um curso crônico ou subagudo após a exposição à aflatoxina por várias semanas ou meses (KELLERMAN et al., 2005), mas casos agudos já foram relatados em bovinos (MCKENZIE et al., 1981, LAFLUF et al., 1989). A doença foi reproduzida em bovinos pela administração de doses orais de aflatoxina ou por administração de alimentos contaminados por aflatoxina (ALLCROFT; LEWIS, 1963; GARRET et al., 1968; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971, PIER et al., 1976; PATTERSON; ANDERSON, 1982; RICHARD et al., 1983). Mesmo assim ainda são observadas diferenças significativas nas doses consideradas tóxicas para bovinos nos surtos espontâneos da doença, descritos na literatura, e discrepâncias nas manifestações clínicas e achados patológicos dessa doença são frequentes entre os vários estudos naturais e experimentais. A evolução das lesões hepáticas nessa doença foi investigada em apenas um desses estudos experimentais, no qual a quantidade de aflatoxinas no farelo de amendoim fornecido aos bovinos não era conhecida (ALLCROFT; LEWIS, 1963; HILL, 1963).

O presente estudo foi realizado em duas partes e teve como objetivo relatar e caracterizar a intoxicação espontânea e experimental por aflatoxinas em bovinos, além de estudar a patogênese da doença e estabelecer a dose tóxica para espécie. Na primeira parte, descreve-se a intoxicação espontânea em bezerros (PIEREZAN, F. et al. Surto de aflatoxicose em bezerros no Rio Grande do Sul, *Pesq. Vet. Bras.* v. 30, p. 418-422, 2010). Na segunda etapa são descritos dois experimentos realizados com o objetivo de reproduzir experimentalmente a intoxicação por aflatoxina em bezerros (PIEREZAN, F. et al. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros, *Pesq. Vet. Bras.* v. 32, p. 607-618, 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos históricos

A descoberta das aflatoxinas ocorreu imediatamente após surtos de uma doença de etiologia desconhecida, na Inglaterra, em 1960, chamada na época de “*turkey X disease*” (BLOUNT, 1961). Os surtos dessa doença, que se estenderam pelo ano seguinte, causaram a morte de aproximadamente 100.000 perus, de 4 a 6 semanas de idade, e de dezenas de milhares de patinhos e faisões. Surtos semelhantes foram observados, posteriormente, em suínos, bovinos e ovelhas (SARGEANT et al., 1961). A morte de animais em tais escalas e consequentes perdas econômicas estimularam as investigações pelo agente causador dessa doença (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978).

Os primeiros surtos da doença em perus ocorreram em propriedades de uma área restrita da periferia de Londres e foram associados a alimentos produzidos por apenas uma fábrica de ração na cidade. Enquanto numerosos ingredientes dessa ração eram testados para verificar sua toxicidade ou a presença de metabólitos tóxicos conhecidos, novos surtos começaram a ocorrer em outras áreas da cidade. Constatou-se então que o ingrediente comum entre as rações fornecidas para os animais nesses surtos era um farelo de amendoim importado do Brasil (RICHARD, 2008). Esse produto, chamado de farelo Rosetti (nome da embarcação que fez o transporte do alimento), foi importado do Brasil pela empresa Old Cake Mills Ltda. e apresentava sinais de contaminação fúngica (SHADANAIIKA, 2005).

Nenhum fungo foi isolado do farelo de amendoim brasileiro, mas, em pesquisas realizadas com farelo de amendoim proveniente de Uganda, envolvido em surtos idênticos no Quênia, o fungo *Aspergillus flavus* foi isolado. Um material fluorescente azulado, extraído por clorofórmio de uma dessas culturas, foi administrado a patos de um dia, que desenvolveram lesões hepáticas semelhantes às observadas nos casos da “*turkey X disease*” (SARGEANT et al., 1961). Nos anos seguintes, outros pesquisadores demonstraram que esse material fluorescente azulado, quando analisado por cromatografia de camada delgada, poderia ser dividido em outros compostos. Essas substâncias foram identificadas quimicamente, denominadas “aflatoxinas” (de *Aspergillus* e *flavus*) e classificadas inicialmente como B1, B2, G1 e G2 (VAN DER ZIJDEN et al., 1962; NESBITT et al., 1962;

ASAO et al., 1963). Curiosamente, o mesmo isolado de fungo da amostra de farelo de Uganda foi posteriormente enviado aos Estados Unidos, reclassificado como *A. parasiticus* e armazenado como a amostra NRRL 2999 no *U.S Department of Agriculture's Agricultural Research Service* (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978). As descrições da “turkey X disease” e a descoberta subsequente das aflatoxinas como agentes causadores dessa doença permitiram aos pesquisadores identificar surtos prévios dessa enfermidade em diferentes espécies animais.

Uma doença fatal e esporádica de porquinhos-da-Índia, conhecida como “hepatite exsudativa”, foi observada em 1954 e inicialmente atribuída a deficiências nutricionais. A doença era caracterizada por lesões no fígado, pâncreas e tecidos linfóides e por ascite (PAGET et al., 1954). Posteriormente, a doença foi reproduzida experimentalmente nessa espécie e esses relatos foram identificados como os primeiros casos conhecidos da intoxicação por aflatoxinas em animais (PATERSON et al., 1962).

Nos Estados Unidos, em 1955, surtos de uma doença em cães, conhecida como “hepatite X”, foram associados ao consumo de uma ração contendo farelo de amendoim. Outros surtos da mesma doença haviam ocorrido entre 1951-1952 em vários estados americanos. Embora a doença tenha sido reproduzida pelo fornecimento da ração contaminada a outros animais, a etiologia desses casos não foi estabelecida (NEWBERNE et al., 1955). Em 1957, uma doença fatal em suínos e bovinos foi descrita nesse mesmo país. A doença foi associada à presença de milho mofado na ração. Dessa ração foram isoladas culturas puras de *A. flavus* e *Penicillium rubrum*, que foram espalhadas sobre o milho e então fornecidas para outros suínos. Esses animais desenvolveram sinais clínicos semelhantes aos observados nos casos naturais da intoxicação. No entanto, nesse estudo, maior ênfase foi colocada na ingestão das culturas de *P. rubrum* como a causa dessa doença (BURNSIDE et al., 1957).

A. flavus foi também incriminado como a causa de uma doença em gatos e coelhos, em 1957, provocada pelo consumo de extratos de nozes contaminados com o fungo (KULIK et al., 1957). Nos anos seguintes *A. flavus* foi associado com uma doença em galinhas, conhecida como “síndrome hemorrágica das galinhas” (FORGACS et al., 1958). O desenvolvimento de hepatomas em trutas, observados em 1960, também foi atribuído a essas toxinas (JACKSON et al., 1968).

As primeiras descrições de aflatoxicose em bovinos, foram realizadas na década de 60, no Reino Unido (LOOSMORE; MARKSON, 1961; SARGEANT et al., 1961; CLEGG; BRYSON, 1962). Todos esses surtos foram associados ao consumo do mesmo farelo de amendoim importado do Brasil, que estava envolvido nos casos da “turkey X disease”. Na

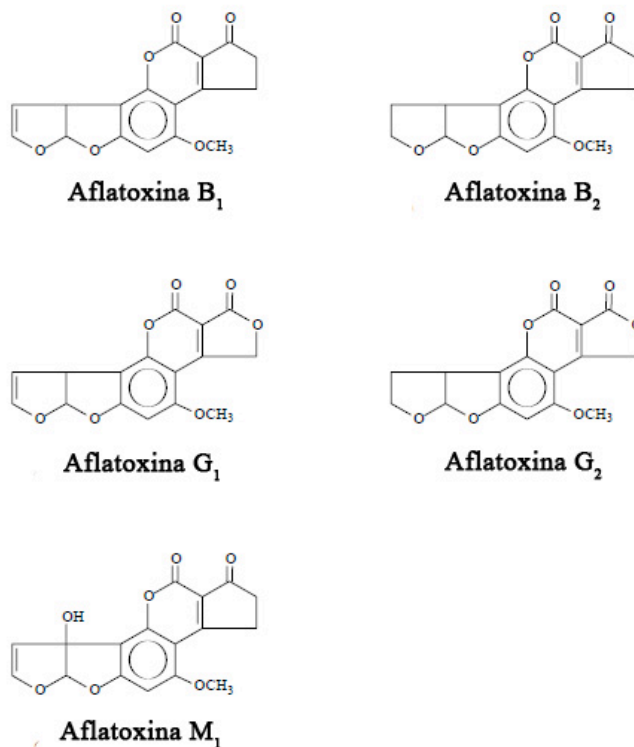
mesma década, a doença foi reproduzida experimentalmente em bovinos pela administração de farelo de amendoim contaminado (ALLCROFT; LEWIS, 1963) e casos naturais foram reportados nos Estados Unidos (AUST, 1964) e na Índia (GOPAL et al., 1968).

Em 1963, os extratos do leite de vacas alimentadas com farelo de amendoim contaminado com aflatoxinas foram administrados a patinhos e induziram lesões hepáticas semelhantes às produzidas por essas toxinas. No entanto, exames de cromatografia de camada delgada demonstraram a ausência de aflatoxina B1 nesse produto (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1963). Posteriormente, a análise por cromatografia de camada delgada em sílica gel do leite de animais ingerindo essas toxinas, revelou um composto tóxico fluorescente azul violeta, diferente das demais aflatoxinas (DE IONGH et al., 1964). Devido à detecção primária nesse produto, essa aflatoxina foi denominada “*milk toxin*” ou “aflatoxina M” (AFM) (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978). Dessa forma, AFM1 e AFM2 foram isoladas de amostras de urina e leite e identificadas como metabólitos das AFB1 e AFB2 em mamíferos (DE IONGH et al., 1964). Nas décadas seguintes, outras substâncias ou metabólitos relacionados às aflatoxinas, como a aflatoxina GM1, GM2, M2a, GM2a, B2a, G2a, aflatoxicol, aflatoxina H1, P1 e Q1 também foram descobertas (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978). Mesmo que aproximadamente 20 aflatoxinas tenham sido identificadas, apenas quatro delas (B1, B2, G1 e G2) ocorrem naturalmente (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

2.2 Características físicas e químicas das aflatoxinas

A natureza química e física das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram caracterizadas nos anos seguintes a descoberta dessas substâncias. Esses compostos foram classificados como derivados difurocumarínicos (VAN DER ZIJDEN et al., 1962; ASAO et al., 1963). A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, pois são compostos químicos simples e de baixo peso molecular, que apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide. A molécula de aflatoxina B1 contém um anel ciclopentona, enquanto que as aflatoxina G1 apresentam anel δ -lactona ligado ao núcleo cumarínico. As aflatoxinas B2 e G2 são di-hidro derivados das aflatoxinas B1 e G1 e são formados pela adição de hidrogênio através de uma ligação dupla isolada na molécula original (ASAO et al., 1963). Essas estruturas podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas



Fonte: IARC, 1997

As aflatoxinas, assim como outros compostos heterocíclicos, são substâncias fluorescentes com características próprias, o que possibilita sua separação devido à cor de sua fluorescência sob iluminação ultravioleta de ondas largas. As aflatoxinas B (do inglês, *blue*), representadas pela AFB1 e AFB2 apresentam uma fluorescência azul, enquanto que as aflatoxinas G (do inglês, *green*), apresentam uma fluorescência esverdeada (AFG1) ou a verde-azulada (AFG2) (SARGEANT, 1963; OPAS, 1983). A AFM1 emite fluorescência azul-violeta (DE IONGH et al., OPAS, 1983).

Essas substâncias são cristalinas, incolores ou amarelo-claras, termoestáveis, levemente solúveis em água (10-20 µg/ml), insolúveis em solventes não polares e solúveis em solventes moderadamente polares, como metanol, clorofórmio e, especialmente, dimetil sulfóxido. São instáveis em luz ultravioleta, na presença de oxigênio, em pH extremo (<3 ou

>10) e em soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (IARC, 1997). As características físico-químicas das principais aflatoxinas são demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas das principais aflatoxinas

Aflatoxina	Fórmula Química	Massa Molecular	Temperatura de fusão	Emissão de fluorescência em nanômetros (nm) e cor*
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425-azul
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425-azul
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450-verde
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450-verde
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425- azul violeta
AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425-violeta
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	425

*Sob luz ultravioleta
Fonte: OPAS (1983)

A decomposição das aflatoxinas ocorre na faixa de temperatura entre 237-306°C, variando de acordo com a atividade de água (a_w), pH do substrato e tempo de exposição ao calor. Por outro lado, os raios ultravioletas da luz do sol são muito eficazes na desativação das moléculas de aflatoxinas. Não há um método totalmente eficaz para a inativação das aflatoxinas, sendo que eficiência de cada processo depende do tipo de alimento a ser descontaminado, sua atividade de água, os tipos de aflatoxinas nele presentes, o nível de contaminação e o grau de associação em que as aflatoxinas estão ligadas aos constituintes do alimento, principalmente às proteínas (RUSTOM, 1997).

Apesar das semelhanças estruturais, as aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB₁, além de ser a mais frequentemente encontrada nos cereais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ (KELLERMAN et al., 2005). A magnitude da toxidez da AFG₂, AFB₂ e AFG₁ correspondem a 10, 20 e 50% da AFB₁, respectivamente (TERAO; UENO, 1978).

Embora a presença concomitante das AFB1, AFB2 e AFG1 ser frequentemente comum na mesma amostra, a AFB1 geralmente compõe a maior parte das toxinas (60-80% do total de aflatoxina na amostra). AFB2, AFG1 e AFG2 não ocorrem na ausência de AFB1 (IARC, 1997).

2.3 Fungos produtores e ocorrência natural

Aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*. *Aspergillus flavus* produz apenas aflatoxinas B e, ocasionalmente, ácido ciclopiazônico (CPA), enquanto que *A. parasiticus* produz ambas aflatoxinas B e G, mas nunca CPA. Outras espécies fúngicas relacionadas a *A. flavus*, podem produzir aflatoxinas em menores proporções, como *A. nomius* e *A. bombycis*, que produzem ambas aflatoxinas B e G, *A. pseudotamarii*, que produz as aflatoxinas B e CPA, e *A. ochraceoroseus*, que produz a aflatoxina B e esterigmatocistina (IARC, 1997).

Esses fungos ubíquos e saprofíticos crescem em uma ampla variedade de grãos, rações e alimentos comestíveis. Os principais produtos susceptíveis ao desenvolvimento desse fungo incluem amendoim, milho (pipoca, canjica e grãos), trigo, arroz, soja, castanha-do-Pará, nozes, avelã, castanha-de-caju, amêndoas, frutas secas, temperos, semente de algodão, mandioca, óleos vegetais, cacau, entre outros que, normalmente, são utilizados na composição de alimentos e rações (CALDAS et al., 2002). Metabólitos das aflatoxinas (AFM1 e AFM2) podem ser observados em alimentos de origem animal como leite, queijo, carne, fígado e ovos (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978). Considerando que o milho (tanto o grão como a silagem), a soja e outros cereais são a base da dieta animal, esses alimentos são os mais frequentemente analisados, especialmente o primeiro. No Brasil, em 53.318 amostras de milho analisadas entre 1986 e 2009, provenientes de todas as regiões do país, 49% estavam contaminadas com aflatoxinas. O nível médio de aflatoxinas observado nessas amostras foi de 11,2 ppb. Em 941 amostras de silagem de milho analisadas nesse mesmo período, 20% estavam contaminadas e apresentaram nível médio de 2,1 ppb de aflatoxinas (MALLMANN et al., 2009). Em 333 amostras de soja, analisadas entre 2000-2003, o nível de contaminação foi de 15,01%, com nível médio de aflatoxinas de 3,99 ppb (MÜRMAN et al., 2003).

A formação de aflatoxinas é influenciada por fatores físicos, químicos e biológicos. Os fatores físicos incluem a temperatura, atividade da água, umidade do substrato, umidade

relativa do ar, aeração, luz, danos mecânicos e tempo de armazenamento. Os fatores químicos incluem a composição e a natureza do substrato, pH e o teor de oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e outros gases no ambiente. Os fatores biológicos são aqueles associados com a espécie hospedeira, como, por exemplo, a linhagem toxigênica, quantidade de esporos viáveis, competição microbiana e presença de insetos (JARVIS, 1971).

Dentre os fatores físicos, a temperatura, a umidade e a atividade da água do substrato aparentam ter maior importância para a formação dessas toxinas. A temperatura ideal para o crescimento fúngico e produção de toxinas é de 25°C a 32°C e a temperatura limitante é de 12°C a 41°C, com algumas variações conforme a cepa fúngica e o substrato (NORTHOLT et al., 1977; KLICH, 2007). O conteúdo de água de alimentos e grãos pode ser expresso de duas maneiras: em termos de umidade e em relação à atividade de água (a_w). A umidade é expressa em porcentagem e demonstra o conteúdo total de água no material, enquanto que a atividade de água mostra a quantidade de água livre (não ligada a moléculas), que é disponível no substrato para a utilização imediata pelo fungo. Em relação à atividade da água (a_w), a produção máxima de aflatoxinas ocorre em níveis de 0,95-0,99 a_w , com um valor mínimo de 0,84 a_w para o crescimento fúngico e 0,78 a_w para produção de aflatoxinas por *A. flavus*, e de 0,84 a_w para crescimento fúngico e 0,7 a_w para produção de aflatoxinas pelo *A. parasiticus*. Em relação ao teor de umidade no grão, níveis acima de 10% favorecem a produção de toxinas que é máxima em umidade de 25% a 30°C (DIENER; DAVIS, 1969). Os estudos sobre o efeito da luz sobre a produção de aflatoxinas são controversos, no entanto, Bennet e Papa (1988) demonstraram que a luz não tem efeito inibitório sobre esse processo.

O grau de oxigenação é importante para o crescimento do fungo e produção de aflatoxinas, pois ambos são processos aeróbicos. Porém, a relação entre a necessidade de oxigênio e dióxido de carbono varia consideravelmente entre as espécies e amostras. Baixas concentrações de CO₂ são consideradas benéficas para a germinação de esporos e produção de aflatoxinas. As concentrações de CO₂ maiores que 20% inibem a germinação de esporos e maiores que 10% suprimem a produção de toxinas (DIENER; DAVIS, 1969). Uma diminuição na concentração de oxigênio para menos de 20% ou um aumento para 90% ou mais provoca a inibição da formação de aflatoxinas (LANDERS et al., 1967). Um aumento na concentração de nitrogênio também suprime a formação de aflatoxinas (EPSTEIN et al., 1970). Em relação à umidade relativa do ar, os níveis ideais para o crescimento do fungo e produção da toxina são de 85% a 90% ou mais. O pH ideal para o desenvolvimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* situa-se entre 5 e 8, porém esses fungos podem crescer em uma ampla faixa de pH (2 a 11) (BASAPPA et al., 1970). Nutrientes específicos, tais como sais minerais

(especialmente zinco), vitaminas, ácidos graxos, aminoácidos e fontes de energia (carboidratos) são necessários para a formação de aflatoxinas (WYATT, 1991). A fonte de carboidrato tem forte influência na produção de aflatoxinas e a sacarose é a fonte em que se observa maior produção de aflatoxinas, seguida pela glicose, maltose e frutose (ENGEL, 1975).

Quanto aos fatores biológicos, observa-se maior produção de aflatoxinas por isolados de fungos que apresentam escleródios menores. Porém, não são observadas diferenças de produção relacionadas à quantidade maior ou menor de escleródios no isolado. A redução da esporulação do fungo está correlacionada com a diminuição da produção de aflatoxinas. Além disso, alguns isolados de *A. flavus* são incapazes de produzir aflatoxinas, enquanto que quase todos os isolados de *A. parasiticus* produzem essas substâncias (KLICH, 2007).

2.4 Biotransformação das aflatoxinas

Uma vez absorvida, a aflatoxina B1 é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina sanguínea e, em menor escala, a outras proteínas. Formas de aflatoxinas ligadas e não ligadas a proteínas séricas distribuem-se para os tecidos, especialmente para o fígado (WYATT, 1991).

Após serem depositadas no fígado, as aflatoxinas absorvidas são biotransformadas, primariamente, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas (BIEHL; BUCK, 1987). Estas enzimas, pertencentes a superfamília de enzimas citocromo P-450, constituem parte do processo de destoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo (FORRESTER et al., 1990). A forma ativada da AFB1 é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB1, ou AFB1-epóxido (anteriormente denominado AFB1-2,3 epóxido), originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranóide da molécula de AFB1 (WYATT, 1991).

As aflatoxinas são biotransformadas pelo sistema microsossomal hepático em metabólitos muito tóxicos, como AFB_{2a}. Estes compostos são altamente eletrofílicos e capazes de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (BIEHL; BUCK, 1987). Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. A AFB1-epóxido pode

também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, através de glutathione-S-transferases, constituindo importante via de destoxificação deste composto (HAYES et al., 1991).

A ligação da AFB1-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB1 (HSIEH; ATKINSON, 1991). A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53. Essas ligações de aflatoxina com proteínas provocam insuficiência hepática, levando a uma profunda alteração nas propriedades funcionais e na síntese das proteínas (WYATT, 1991).

2.5 Epidemiologia da aflatoxicose em bovinos

Aflatoxicose é uma doença comum em animais domésticos, principalmente em aves, suínos e cães, e tem ampla distribuição mundial. No entanto, surtos documentados de aflatoxicose em bovinos são raros e distribuídos esparsamente. A condição nessa espécie foi relatada inicialmente na década de 1960, no Reino Unido, (LOOSMORE; MARKSON, 1961; CLEGG; BRYSON, 1962) associada à ingestão de torta de amendoim contaminada pelo fungo e contendo aflatoxina; no entanto, é muito provável que a doença descrita em suínos e bovinos nos anos 1950 nos Estados Unidos (SIPPEL et al., 1953; BURNSIDE et al., 1957) também se tratasse de aflatoxicose. Desde então a doença foi relatada em bovinos nos Estados Unidos (AUST, 1964; COLVIN et al., 1984; HALL et al., 1989; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; RAY et al., 1986), Índia (GOPAL et al., 1968; VAID et al., 1981), Tailândia (PEDUGSORN et al., 1980), Austrália (MCKENZIE et al., 1981), África do Sul (VAN HALDEREN et al., 1989), Brasil (MELO et al., 1999), Uruguai (LAFLUF et al., 1989; DUTRA, 2011) e Itália (D'ANGELO et al., 2007). A doença tem sido reproduzida em bovinos pela administração de doses orais de aflatoxina ou por administração de alimentos contaminados por aflatoxina (ALLCROFT; LEWIS, 1963; GARRET et al., 1968; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976; PATTERSON; ANDERSON, 1982; RICHARD et al., 1983; HELFERICH et al., 1986).

Bovinos são considerados animais medianamente sensíveis à intoxicação por aflatoxinas em uma classificação dividida em três graus de susceptibilidade. Nessa escala

consideram-se: (1) animais bastante sensíveis ($DL_{50} \leq 1$ mg/kg) em que estão incluídos patinhos, trutas arco-íris, cobaias, coelhos, cães, gatos, ratos jovens e perus jovens; (2) animais medianamente sensíveis (que necessitam uma dose de aflatoxina dez vezes maior que os animais do primeiro grupo), como suínos, macacos, ratos, bezerros, faisões, pintos, furões, hamsters, vacas, doninhas e perdizes; e (3) animais resistentes, como ovinos e camundongos (SCHOENTAL, 1967).

Entre os casos naturais da intoxicação há grande variação dos níveis de AFL encontrados no alimento (inclusive entre as amostras de um mesmo surto), no tipo de alimento contaminado e no tempo de consumo desse produto. No primeiro surto em que as doses tóxicas são descritas, o consumo de torta de amendoim contendo 1.100-25.000 ppb de AFL provocou a morte de 58 bovinos, na Índia. O tempo de consumo desse alimento não foi informado (GOPAL et al., 1968). Em outro surto, envolvendo o consumo de farelo de amendoim, os níveis de aflatoxinas variavam conforme a idade dos animais, que consumiram um produto contendo níveis de 1.100 ppb de AFL do primeiro ao sexto mês de vida e de 600 ppb de AFL por mais três meses, quando as mortes começaram a ocorrer (PEDUGUSORN et al., 1980). Na Austrália, em um surto nessa mesma década, os níveis de aflatoxinas encontrados no feno de amendoim fornecido aos animais variavam de 20-424 ppb de AFL. Quando analisada apenas a semente na casca, coletada em meio ao feno, o nível de AFL foi de 2.230 ppb. Nesse surto, o produto foi consumido por apenas sete dias e os animais morreram de forma aguda (MCKENZIE et al., 1981). Em um surto nos Estados Unidos, a doença foi associada ao consumo de milho contaminado. Nesses casos o alimento foi consumido durante três meses e continha 1.500 ppb de AFL (COLVIN et al. 1984). Níveis de 96 a 1.700 ppb de AFB1 foram encontrados em sementes de algodão da ração, consumida durante dois meses em um confinamento nos Estados Unidos, que provocou a morte de 40 bovinos (OSWEILLER; TRAMPEL, 1985). Ray et al. (1986), associaram a ocorrência de abortos e morte das vacas mães ao consumo de amendoim contaminado com altos níveis de aflatoxinas (77.000 ppb) por um período de apenas quatro dias. No único surto envolvendo o pastoreio de milho-doce, que não havia sido colhido, o nível de aflatoxinas nesse produto foi de 2.365ppb. Os bovinos foram colocados na lavoura quatro a cinco meses antes da ocorrência do surto, mas o maior consumo das espigas ocorreu um mês antes dos primeiros sinais da doença (HALL et al., 1987). Em um surto na África do Sul, os níveis de aflatoxinas encontrados em amostras de milho contaminado, coletadas na propriedade onde ocorreram os casos, variavam de 1.387 a 11.790 ppb. O milho era proveniente de outra propriedade e apresentava alta contaminação. Nesse surto, o tempo de consumo do alimento foi de dois a

três meses (VAN HELDEREN et al., 1989). No primeiro relato de uma doença em bovinos associada a aflatoxinas no Brasil, níveis de 5.000 ppb de AFB1 foram encontrados em amostras de polpa cítrica fornecida aos animais pelo curto período de dez dias (MELO et al., 1999). Na Itália, a morte de três animais apresentando lesões hepáticas crônicas e sinais de encefalopatia hepática foi associada ao consumo de farelo de milho mofado, contendo 1.670 ppb de AFL. O tempo de consumo desse produto não foi informado (D'ANGELO et al., 2007). Mais recentemente, no Uruguai, um surto de aflatoxicose foi associado ao consumo de silagem de sorgo em grão úmido. Nesse surto, o nível de AFL encontrado foi de 20 ppb e o tempo de consumo do produto foi de 45 dias (DUTRA et al., 2011).

A variação entre as doses tóxicas mínimas entre os estudos experimentais não é tão ampla como as doses tóxicas descritas nos surtos espontâneos, como demonstrado no parágrafo anterior. No entanto, as diferentes unidades de quantificação da toxina (ppb ou mg/kg de peso vivo/dia), dificultam a compreensão dos valores descritos nesses experimentos. Em um desses experimentos, cinquenta bezerros foram divididos em cinco grupos de 10 animais cada, que receberam ração contendo 0, 100, 300, 700 e 1.000 ppb de AFB1. A intoxicação foi observada em animais que receberam ração com 700 ppb de AFB1 ou mais. Nesses dois grupos houve redução do ganho de peso. Dois novilhos do grupo da ração com 1.000 ppb de AFB1 morreram no 59° e 137° dias do experimento e seus fígados eram fibróticos. Lesões hepáticas semelhantes foram observadas em um animal do grupo que recebia 1.000 ppb e em outros dois animais do grupo de 700 ppb que foram sacrificados aos 133 dias do experimento (GARRET et al., 1968). Em outro experimento (LYNCH et al., 1970), em que bezerros ingeriram ração com aflatoxinas nas doses de 0,008 a 0,08mg/kg de peso corporal/dia por seis semanas, observaram-se alterações nas enzimas de função hepática já nos animais que recebiam 0,02mg/kg/dia; os animais foram sacrificados e os de maior dosagem mostravam fibrose hepática. Alterações semelhantes ocorreram quando a aflatoxina foi administrada por via oral diluída em propilenoglicol e etanol. Os bezerros foram sacrificados após seis semanas e a maioria dos efeitos da aflatoxicose ocorreu nas doses maiores (0,08 e 0,10mg/kg/dia) (LYNCH et al., 1971). Pier et al. (1976) administraram aflatoxina contida em cápsulas de gelatina a três bezerros nas doses de 0,1, 0,2 e 0,5mg/kg/dia. O bezerro que recebeu 0,5mg/kg/dia morreu no 14° dia do experimento e na necropsia foram encontradas icterícia, hemorragia e fibrose hepática associada à proliferação de ductos biliares. Lesões hepáticas semelhantes foram encontradas no bezerro que recebeu 0,2mg/kg de p.v./dia e que foi sacrificado no 32° dia do experimento. Em outro experimento, uma ração contendo milho contaminado com 800 ppb de AFB1, foi administrada a dois

grupos de cinco novilhas, por 105 e 122 dias. Um terceiro grupo de cinco novilhas recebeu uma ração sem aflatoxinas pelo mesmo período. Nesse experimento, não foram observadas lesões hepáticas e alterações no ganho de peso ou dos parâmetros bioquímicos nos animais dos grupos tratamento e controle (RICHARD et al., 1983). No estudo conduzido por Helferich et al. (1986), quarenta novilhas foram divididas em quatro grupos de 10 animais cada, que receberam farelo do algodão contendo 0, 60, 300 e 600 ppb de AFB1, durante 155 dias. Nenhuma alteração foi observada nos bovinos recebendo 0, 60 e 300 ppb de AFB1. Os bovinos recebendo 600 ppb de AFB1 apresentaram diminuição do ganho de peso e do consumo de alimento e lesões hepáticas sutis.

Animais jovens são mais suscetíveis a intoxicação do que animais adultos (KELLERMAN et al., 2005). Na ampla maioria dos surtos espontâneos de aflatoxicose em bovinos, os animais afetados tinham de três meses a um ano de idade (AUST, 1964; GOPAL et al., 1968; PEDUGUSORN et al., 1980; MCKENZIE et al., 1981; VAN HELDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al. 2007). Poucos casos naturais são descritos em animais adultos (vacas em lactação, vacas gestantes ou com cria ao pé) (VAID et al., 1981, RAY et al., 1986; HALL et al., 1989) ou com 2-3 anos de idade (DUTRA et al., 2011). Nos estudos em que a doença foi reproduzida experimentalmente, os bovinos utilizados eram jovens, com 4-8 meses de idade (GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; ; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976).

Em apenas três surtos espontâneos foi possível determinar a morbidade, mortalidade e letalidade da doença, com base no número de bovinos no rebanho, de doentes e de mortos. No surto de aflatoxicose descrito por Pedugsorn et al. (1980), a morbidade foi de 100% e a mortalidade e letalidade foram de 40%, enquanto que no surto descrito por Osweiller e Trampel (1985), a morbidade foi de 1,42%, a mortalidade de 0,71% e a letalidade de 50%. Já no surto escrito por Dutra et al. (2011), a morbidade foi de 3,22%, a mortalidade de 1,61% e letalidade de 50%. Em alguns dos demais surtos espontâneos apenas a mortalidade pode ser determinada e ampla variação pode ser observada entre os relatos. Os maiores índices de mortalidade descritos foram de 50% (GOPAL et al., 1968), 46,6% (COLVIN et al., 1984) e 28% (VAN HELDEREN et al., 1989), seguidos por índices menores de 18,8% (MCKENZIE et al., 1981) e 0,66% (HALL et al., 1989).

A intoxicação por aflatoxinas em bovinos ocorre principalmente em animais confinados (COLVIN et al., 1984; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; D'ANGELO et al., 2007; DUTRA et al., 2011) e em animais de produção leiteira (GOPAL et al., 1968; VAID et al. 1981). No entanto, há relatos de surtos ocasionais de aflatoxicose em bovinos em

pastoreio, que ingeriram milho não colhido ou mal colhido ainda na lavoura (SIPPEL et al., 1953; HALL et al., 1989).

2.6 Sinais clínicos

A aflatoxicose em bovinos geralmente segue um curso crônico ou subagudo de várias semanas ou meses após a exposição à aflatoxina (KELLERMAN et al., 2005), mas casos agudos já foram relatados (MCKENZIE et al., 1981; LAFLUF et al., 1989). Os principais sinais clínicos observados em casos naturais e experimentais de aflatoxicose, seguindo uma ordem dos mais comumente descritos para os incomuns, incluem mau estado nutricional geral, perda gradual do apetite, diminuição do ganho de peso, perda de peso, anorexia, pelos ásperos, baixa na produção de leite e decréscimo na resistência a infecções. Sinais terminais incluem bruxismo, dor abdominal, tenesmo, prolapso retal e diarreia, que pode ser tingida de sangue (GOPAL et al., 1968; GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976; PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; PATTERSON; ANDERSON, 1982; COLVIN et al., 1984; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al., 2007; DUTRA et al., 2011). A morte ocorre geralmente dois a cinco dias após o aparecimento dos sinais clínicos mais graves (PEDUGSORN et al., 1980; MCKENZIE et al., 1981, D'ANGELO et al., 2007).

Sinais neurológicos foram descritos em vários surtos espontâneos de aflatoxicose em bovinos (GOPAL et al., 1968, PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985), mas foram descritos mais detalhadamente por D'angelo et al., (2007), que associou esses sinais a um quadro de encefalopatia hepática. Nesses relatos os sinais neurológicos eram caracterizados por andar em círculos, apatia, depressão, sonolência, ausência de resposta ao ambiente e hiperexcitabilidade.

Hemorragias, tanto nas mucosas, como na forma de epistaxe, já foram descritas em casos naturais de aflatoxicose em bovinos, principalmente naqueles com evolução aguda (MCKENZIE et al., 1981; VAID et al., 1981). Hemorragias no mesentério e sob a cápsula esplênica e hematúria foram observadas em um bovino recebendo 0,5 mg/kg/dia, que também morreu de forma aguda, 14 dias após o início do experimento (PIER et al., 1976). Apenas raramente os bovinos desenvolvem fotossensibilização associada à aflatoxicose (COLVIN et al. 1984 et al. 1984, MCKENZIE et al., 1981).

A ocorrência de abortos antecedendo a morte das vacas foi relatada em um surto envolvendo o consumo de amendoim com altas doses de aflatoxinas (77.000 ppb) (RAY et al., 1986).

Alterações bioquímicas nos casos de aflatoxicose são representadas principalmente pelo aumento da atividade sérica das enzimas hepáticas. Dentre essas enzimas, as mais comumente alteradas são a fosfatase alcalina (FA) e a gamaglutamil transferase (GGT) (GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; VAID et al., 1981; MCKENZIE et al., 1981; RAY et al., 1986). Outras alterações bioquímicas descritas incluem a diminuição do nível da enzima sérica lactato desidrogenase (KEYL; BOOTH, 1970) e aumento da bilirrubina total e conjugada (MCKENZIE et al., 1981; COLVIN et al., 1984). Embora alguns estudos demonstrem um aumento nos níveis da AST em casos de aflatoxicose (PIER et al., 1976, D'ANGELO et al., 2007), outros estudos demonstram que os níveis dessa enzima (GARRET et al., 1968, KEYL; BOOTH, 1970), bem como das proteínas totais e da albumina (LYNCH et al., 1970; VAN HALDEREN et al., 1989) permanecem inalterados nos casos dessa doença em bovinos. Alterações hematológicas são raramente descritas e incluem graus leves de anemia ou neutropenia (MCKENZIE et al., 1981).

2.7 Achados de necropsia

O fígado é o órgão alvo nos casos de intoxicação por aflatoxinas em animais (KELLERMAN et al., 2005). Lesões macroscópicas nesses casos são caracterizadas por alterações da cor, tamanho e consistência do órgão, que pode estar amarelo-claro, marrom-bronzeado ou acinzentado, invariavelmente firme ao corte e diminuído ou, mais frequentemente, aumentado de tamanho (GOPAL et al., 1968; GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976; PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; PATTERSON; ANDERSON, 1982; COLVIN et al. 1984; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989, D'ANGELO et al., 2007; DUTRA et al., 2011).

Frequentemente observa-se ascite e edema das dobras do abomaso e do mesocólon e, menos comumente, hidrotórax e edema no tecido subcutâneo ou parede da vesícula biliar (GOPAL et al., 1968; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; PATTERSON; ANDERSON, 1982; COLVIN et al. 1984; OSWEILLER;

TRAMPEL, 1985; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al., 2007; DUTRA et al., 2011). Dilatação da vesícula biliar por líquido é um achado descrito em alguns relatos da doença (GOPAL et al., 1968; MCKENZIE et al., 1981; DUTRA et al., 2011) e, embora seja um achado incidental frequente em necropsias de bovinos, segundo Lynch et al. (1971), nos casos de aflatoxicose, a lesão pode ser provocada pela obstrução do ducto da vesícula biliar devido ao edema da parede do órgão.

Em alguns dos surtos da doença em bovinos os autores relatam graus variados de caquexia no momento da necropsia (GOPAL et al., 1968; COLVIN et al. 1984; VAN HALDEREN et al., 1989) e hemorragias no subcutâneo, fígado, rins e na serosa do trato gastrointestinal (PIER et al., 1976; PEDUGSORN et al., 1980; MCKENZIE et al., 1981; VAID et al., 1981). Icterícia é um achado incomum em casos de aflatoxicose (PIER et al., 1976; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985).

Os achados histológicos estão restritos ao fígado e incluem proliferação de ductos biliares, fibrose, megalocitose, lesão veno-oclusiva e graus variáveis de degeneração gordurosa hepatocelular. Proliferação de ductos biliares é uma das principais lesões observadas nos casos de aflatoxicose. Essa lesão é observada mais frequentemente no parênquima próximo aos espaços porta. O padrão de fibrose observado nos casos de aflatoxicose é periportal, que pode se estender e conectar espaços porta (padrão periportal “em ponte”) ou obliterar totalmente o lóbulo (padrão difuso). A degeneração gordurosa é caracterizada por vacúolos únicos ou múltiplos no citoplasma de hepatócitos e ocorre mais comumente na região centrolobular (GOPAL et al., 1968; GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976; PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; PATTERSON; ANDERSON, 1982; COLVIN et al. 1984; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al., 2007; DUTRA et al., 2011). A lesão veno-oclusiva hepática consiste na obliteração de pequenas veias intra-hepáticas associadas à lesão do endotélio dos sinusóides, acúmulo de eritrócitos e fibrina no espaço subintimal (de Disse), e subsequente fibrose subendotelial (STALKER; HAYES, 2007). Lesão veno-oclusiva tem sido relatada em bovinos afetados por aflatoxicose (LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971), seneciose e em seres humanos após quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea (STALKER; HAYES, 2007).

2.8 Diagnóstico e métodos de detecção de aflatoxinas

O diagnóstico da intoxicação por aflatoxinas em bovinos é frequentemente complexo, e o diagnóstico definitivo depende da associação de fatores epidemiológicos, clínicos e patológicos, observados nos casos ou surtos, com a análise micológica do alimento e análise química de alimentos ou tecidos por cromatografia de camada delgada ou fluorodensitrometria e ensaios com a toxina usando patos, galinhas ou embriões de trutas (KELLERMAN et al., 2005).

Uma vez que a presença do fungo não implica necessariamente na presença de toxinas, as determinações analíticas são necessárias para fiscalização, monitoramento e pesquisa. Existem vários fatores que dificultam esse tipo de análise como, por exemplo, distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes contaminados, níveis de contaminação extremamente baixos, extratos contendo substâncias que possam interferir nos exames e a natureza variada das amostras, as quais requerem diferentes procedimentos na extração (AMARAL; MACHINSKI, 2006).

O processo de determinação de aflatoxinas é composto pela colheita da amostra, sua moagem, subamostragem e, finalmente sua análise. Erros em cada uma dessas etapas implicam em alterações no resultado da análise, que podem ser reduzidas aumentando-se o volume da amostra (e subamostra) e o número de amostras (e o número de subamostras); diminuindo-se o tamanho da partícula durante a moagem; e utilizando-se tecnologias automatizadas e que propiciem a maior precisão possível (MALLMANN et al., 2013).

Na prática, as aflatoxinas têm sido detectadas por técnicas físico-químicas e biológicas. Dentre as técnicas para verificar a presença de aflatoxina em alimentos estão as físico-químicas cromatográficas e instrumentais. As técnicas biológicas incluem os bioensaios e imunoenaios (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é a técnica de referência para muitos laboratórios brasileiros porque não necessita de equipamentos onerosos e é confiável. É muito utilizado o sistema-solvente tolueno acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico – 70:50:50:20. A quantificação é realizada através da técnica visual sob luz ultravioleta (UV) ou a densitometria. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase normal e fase reversa têm sido usadas com detecção por absorção UV, fluorescência, espectrometria de massas e amperométrica (AMARAL; MACHINSKI, 2006).

Existem atualmente no comércio vários tipos de testes baseados em métodos

imunoquímicos tanto para detecção qualitativa como quantitativa dessas toxinas. Na década de 80 foi desenvolvido o ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) para a detecção de aflatoxinas. No que se refere às micotoxinas é menos dispendioso do que muitos testes tradicionais, além de altamente seletivo para determinados tipos de toxinas. O teste ELISA detecta e amplifica a reação antígeno-anticorpo pela ligação covalente entre enzima-anticorpo ou enzima-analito, cuja presença é subseqüentemente determinada pela adição de enzima no substrato. A quantidade de substrato convertido a um dado tempo é indicativo da concentração original do composto a ser analisado (OLIVEIRA et al., 2000).

Um biossensor fluorométrico de imunoafinidade tem sido desenvolvido para detectar e quantificar aflatoxinas. Os imunossensores geralmente se referem a um sistema que acopla um material imunoativo a um transdutor para produzir um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito presente. Ensaio imunoenzimático colorimétrico de injeção sequencial utiliza a célula de jato de fluxo com fase sólida de polimetacrilato adsorvidas com AFB1-albumina sérica bovina. É uma técnica de imunoensaio competitivo indireto com duplo anticorpo tão sensível quanto o ELISA na detecção de AFB1 (AMARAL; MACHINSKI, 2006).

2.9 Diagnóstico diferencial

A intoxicação por *Senecio* spp. ou por outras plantas que contenham alcaloides pirrolizidínicos deve ser incluída no diagnóstico diferencial de aflatoxicose, já que as alterações clínicas e anatomopatológicas nas duas condições são muito semelhantes (CLEGG; BRYSON, 1962; STÖBER, 1970; PEDUGSORN et al., 1980).

2.10 Métodos de controle e tratamento

O método de controle mais eficiente é a remoção do alimento contaminado. A recuperação dos animais afetados depende da quantidade de aflatoxina ingerida e a duração da exposição à toxina. Os animais podem ser tratados sintomaticamente (KELLERMAN et al. 2005).

A prevenção contra o crescimento do fungo é a medida mais eficiente de se controlar a contaminação. O conhecimento dos fatores que favorecem a produção de aflatoxinas é útil para minimizar o problema. A contaminação de grãos por micotoxinas pode acontecer não só através de condições inadequadas de armazenagem, mas também já na lavoura, durante o período pré-colheita. É extremamente importante o uso de práticas como o plantio de genótipos de plantas mais resistentes à contaminação por fungos de armazenagem. São essenciais, também, os procedimentos para diminuição da umidade dos grãos colhidos e a armazenagem dentro de padrões recomendados internacionalmente. O uso de inibidores de crescimento fúngico em grãos armazenados tem sido realizado como um método preventivo. Diversas substâncias químicas têm sido testadas e usadas como inibidores do crescimento fúngico. O grupo dos ácidos orgânicos são os principais anti-fúngicos utilizados e incluem substâncias de estrutura simples como o ácido propiônico, acético, sórbico e benzóico e seus sais de cálcio, sódio e potássio (SANTURIO, 2000).

Os métodos para destoxificação de aflatoxinas em alimentos são necessários quando há falha das medidas preventivas. Esses métodos incluem a remoção física de grãos ardidos, remoção de aflatoxinas por solventes polares, destruição através do calor ou degradação de aflatoxinas por substâncias químicas ou microorganismos. Todos esses métodos podem ou não ser efetivos, mas, com certeza, são extremamente caros e economicamente inviáveis (SANTURIO, 2000). Aflatoxinas são termoestáveis, assim, os tratamentos físicos por calor resultam em pequenas mudanças nos níveis de toxina (TRIPATHI; MISHRA, 2010). Tratamentos químicos usando solventes são capazes de extrair esses compostos causando mínimos efeitos na qualidade nutricional do produto, no entanto, essa tecnologia é ainda pouco prática e cara, além de alterar o odor e sabor dos alimentos. Amoniação é um método efetivo para a descontaminação de produtos contendo aflatoxinas e é de fácil execução. Ozonização é o método químico que vem sendo mais estudado para a descontaminação de aflatoxinas em alimentos, uma vez que o ozônio foi reconhecido como um produto seguro pelo *Food and Drug Administration* (FDA) do governo americano em 2001 (ZORLUENÇ et al., 2008). Atualmente, muitos estudos tem demonstrado que aflatoxinas são suscetíveis a alguns microorganismos como fungos, bactérias e leveduras, que podem ser considerados formas de degradação biológica dessas toxinas. Dessa forma, os alimentos podem ser descontaminados por enzimas produzidas por bactérias, como *Mycobacterium smegmatis* (TAYLOR et al., 2010), ou por fermentação sólida utilizando culturas de outros fungos como *A. oryzae* e *Rhizopus* spp. (CACCIAMANI et al., 2007).

O uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM) na indústria de alimentação animal vem cada vez mais ganhando espaço. Eles atuam no sequestro das micotoxinas, com o objetivo de reduzir a absorção destas espécies no trato gastrointestinal dos animais. Os AAM mais utilizados são à base de aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratado (HSCAS), carvão ativado, colestiramina, glucomanano e argila, sendo que sua eficiência depende das características estruturais tanto das micotoxinas quanto dos próprios AAM, bem como de suas propriedades químicas. Espécies com diferentes polaridades apresentam diferentes interações com diferentes tipos de AAM. Em alguns casos, a baixa polaridade de determinadas toxinas torna ineficaz o uso de sequestrantes como os aluminossilicatos que são conhecidos por sua atração por espécies polares. Nesses casos, são adicionados à formulação dos produtos glicomananos esterificados, componentes da parede interna das leveduras, ou ainda organismos vivos tais como bactérias. Isto provoca a bio-transformação das toxinas através de reações enzimáticas ou processos microbiológicos (hidroxilação, deepoxidação ou de acetilação), aumentando assim a hidrofiliabilidade destas espécies e a maior susceptibilidade à ação do sequestrante (MALLMANN et al., 2013).

3 ARTIGO 1

Surto de aflatoxicose em bezerro no Rio Grande do Sul

Felipe Pierezan, José Carlos Oliveira Filho, Priscila M. Carmo, Ricardo B. Lucena, Daniel R. Rissi, Monique Togni e Claudio S.L. Barros

Publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

v.30, n.5, p.418-422, 2010

DOI: 10.1590/S0100-736X201000050008

Surto de aflatoxicose em bezerros no Rio Grande do Sul¹

Felipe Pierezan², José Carlos Oliveira Filho², Priscila M. Carmo², Ricardo B. Lucena², Daniel R. Rissi², Monique Togni³ e Claudio S.L. Barros^{4*}

ABSTRACT.- Pierezan F., Oliveira Filho J.C., Carmo P.M., Lucena R.B., Rissi, D.R., Togni M. & Barros C.S.L. 2010. [Outbreak of aflatoxicosis in calves in southern Brazil.] Surto de aflatoxicose em bezerros no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(5):418-422. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: claudioslbarros@uol.com.br.

An outbreak of chronic aflatoxicosis is reported in dairy calves. Forty 4-month-old male Holstein calves of approximately 100kg were kept in individual cages of 1.5 x 1.5m and were fed a ration constituted by alfalfa hay, broken corn and milk substitute. Six calves (15%) died after presenting a disease characterized by general unthriftiness, diarrhea, rough hair coats, abdominal pain, prolapsed rectum, grinding of teeth, and lying down and rolling. The clinical course, as observed by the owners, was 2-3 days; however many calves in this lot that did not die, remained underdeveloped. Three calves were necropsied. Necropsy findings included firm, light tan livers and marked hydrothorax, ascites and edema of the mesentery, mesocolon and of the mucosal folds of the abomasum. Main histopathological changes were restricted to the liver and consisted of fibrosis, moderate megalocytosis, biliary duct hyperplasia and veno-occlusive disease. The search for *Senecio* spp. contamination in the alfalfa hay resulted negative. The analysis by thin layer chromatography of the corn fed to calves revealed 5,136 ppb of aflatoxin B₁. A diagnosis of aflatoxicosis was made based on the characteristic clinical signs and pathology, on the absence of *Senecio* spp. in the food and on the presence of high levels of aflatoxin in the corn fed to the calves.

INDEX TERMS: Diseases of cattle, mycotoxicosis, aflatoxicosis, hepatic diseases, pathology.

RESUMO.- Um surto de aflatoxicose crônica é relatado em bezerros de raça leiteira. Quarenta bezerros holandeses machos de quatro meses de idade e aproximadamente 100kg eram mantidos em gaiolas individuais de 1,5 x 1,5m e alimentados com uma ração constituída por feno de alfafa, milho quebrado e substituto de leite. Seis bezerros (15%) morreram após apresentar uma doença caracterizada por mau desenvolvimento geral, diarreia, pelagem áspera, dor abdominal, tenesmo, prolapso de reto e bruxismo. Alguns

bezerros “deitavam e rolavam” no chão da gaiola. A duração do curso clínico, segundo observado pelos proprietários, foi de 2-3 dias; muitos terneiros desse lote que não morreram permaneceram pouco desenvolvidos. Três bezerros foram necropsiados. Os achados de necropsia incluíam fígado firme e castanho-claro, marcados hidrotórax e ascite, e edema do mesentério, mesocólon e das dobras da mucosa do abomaso. Os principais achados histopatológicos estavam restritos ao fígado e consistiam de fibrose, moderada megalocitose, hiperplasia de ductos biliares e lesão veno-oclusiva. A procura por contaminação de *Senecio* spp. no feno de alfafa resultou negativa. A análise do milho do alimento dos bezerros por cromatografia de camada delgada revelou 5.136ppb de aflatoxina B₁. O diagnóstico de aflatoxicose foi feito baseado nos sinais clínicos e patologia característicos, na ausência de *Senecio* spp. na alimentação dos terneiros e na presença de altos níveis de aflatoxina no milho da alimentação dos bezerros.

INDEX TERMS: Doenças de bovinos, micotoxicose, aflatoxicose, doenças hepáticas, patologia.

¹ Recebido em 14 de dezembro de 2009.

Aceito para publicação em 29 de dezembro de 2009.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³ Bolsista de Iniciação Científica (CNPq) junto ao Laboratório de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da UFSM.

⁴ Departamento de Patologia, UFSM, Santa Maria, RS. *Pesquisador 1A do CNPq. Autor para correspondência: claudioslbarros@uol.com.br

INTRODUÇÃO

Aflatoxicose é uma micotoxicose causada por aflatoxinas, metabólitos hepatotóxicos de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (Van Halderen et al. 1989). A doença já foi documentada em humanos, primatas não-humanos, gatos, cães, roedores, aves, bovinos e búfalos após a ingestão de alimento contaminado pelos fungos produtores de aflatoxina (Sastry et al. 1965, Vaid et al. 1981). A condição é mais comum em animais de produção, mas existem diferentes graus de susceptibilidade (Schoental 1967): 1) animais bastante sensíveis ($LD_{50} \leq 1$ mg/kg) onde estão incluídos patinhos, trutas arco-íris, cobaias, coelhos, cães, gatos, ratos jovens e perus jovens; 2) animais medianamente sensíveis (que necessitam uma dose de aflatoxina dez vezes maior que os animais do primeiro grupo), como suínos, macacos, ratos, bezerros, faisões, pintos, furões, hamsters, vacas, doninhas e perdizes; e 3) animais resistentes, como ovinos e camundongos.

Surtos documentados de aflatoxicose em bovinos são raros. A doença nessa espécie geralmente não é tão fulminante como em suínos e segue um curso crônico ou subagudo de várias semanas ou meses após a exposição à aflatoxina (Kellerman et al. 2005), mas casos agudos já foram relatados (McKenzie et al. 1981, Lafluf et al. 1989). A condição em bovinos foi relatada inicialmente na década de 1960 no Reino Unido (Loosmore & Markson 1961, Clegg & Bryson 1962) associada à ingestão de torta de amendoim contaminada pelo fungo e contendo aflatoxina; no entanto, é muito provável que a doença descrita em suínos e bovinos nos anos 1950 nos Estados Unidos (Sippel et al. 1953, Burnside et al. 1957) também se tratasse de aflatoxicose. Desde então a doença foi relatada em bovinos nos Estados Unidos (Aust 1964, Colvin et al. 1984, Hall et al. 1989, Osweiler & Trampel 1985, Ray et al. 1986), Índia (Gopal et al. 1968, Vaid et al. 1981), Tailândia (Pedugsorn et al. 1980), Austrália (McKenzie et al. 1981), África do Sul (Van Halderen et al. 1989) e Uruguai (Lafluf et al. 1989). A doença tem sido reproduzida em bovinos pela administração de doses orais de aflatoxina ou por administração de alimentos contaminados por aflatoxina (Allcroft & Lewis 1963, Garret et al. 1968, Lynch et al. 1970, 1971, Pier et al. 1976, Patterson & Anderson 1982, Richard et al. 1983).

Os sinais clínicos incluem mau estado nutricional geral, pelos ásperos, anorexia, perda gradual do apetite, perda de peso, baixa na produção de leite e decréscimo na resistência a infecções. Sinais terminais incluem bruxismo, andar em círculos, dor abdominal, tenesmo, prolapso retal e diarreia, que pode ser tingida de sangue (McKenzie et al. 1981, Patterson & Anderson 1982, Colvin et al. 1984, Osweiler & Trampel 1985, Van Halderen et al. 1989). Apenas raramente os bovinos desenvolvem fotossensibilização associada à aflatoxicose (McKenzie et al. 1981, Colvin et al. 1984). A morte ocorre geralmente dois dias após o aparecimento dos sinais clínicos mais graves (Loosmore & Markson 1961). Na necropsia o fígado está firme, com um tom grisáceo ou marrom claro; há ainda hidrotórax e ascite acentuados, edema das dobras do abomaso e do mesocólon (Loosmore & Markson 1961, Clegg & Bryson 1962, Osweiler & Trampel 1985, Hall et al. 1989).

Histologicamente são descritos proliferação de ductos biliares, fibrose, megalocitose, lesão venooclusiva e graus variáveis de degeneração gordurosa hepatocelular (Loosmore & Markson 1961, Clegg & Bryson 1962, Vaid et al. 1981, Osweiler & Trampel 1985, Van Halderen et al. 1989).

O objetivo deste trabalho é descrever um surto de aflatoxicose em bezerros no estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Num estabelecimento de produção leiteira no município de Panambi, Rio Grande do Sul, quarenta bezerros foram desmamados logo após terem ingerido o colostro, e colocados em gaiolas individuais 1,5 x 1,5m. Inicialmente os bezerros eram alimentados exclusivamente com substituto de leite reconstituído, mas gradativamente foram introduzidos milho quebrado e feno de alfafa na alimentação. Quando foram examinados neste estudo, aos quatro meses de idade e pesando 100 kg, os bezerros recebiam ração constituída 2 kg de milho quebrado, 1-2 kg alfafa e 4 litros de substituto de leite reconstituído. O milho estava na alimentação por pelo menos dois meses. O surto da doença que é relatada aqui foi observado inicialmente no mês de abril, de 1989, pelo veterinário que prestava serviços para o estabelecimento e que realizou duas necropsias em dois bezerros que haviam morrido espontaneamente; dessas necropsias, o seguinte material foi enviado para exame histológico no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria: fígado, coração, pulmão e rim. Após o exame histopatológico desse material foi estabelecido um diagnóstico presuntivo de seneciose (intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos de *Senecio* spp.) e uma visita à propriedade foi feita no dia seguinte, quando um bezerro afetado já moribundo foi sacrificado e necropsiado. Dessa necropsia o seguinte material foi fixado em formol e processado rotineiramente para histopatologia: fígado, coração, linfonodo hepático, intestino delgado, cólon, ceco, abomaso, encéfalo, rim e baço. Cortes selecionados de fígado foram corados pela técnica do tricrômico de Masson. Foi feita uma cuidadosa procura por espécimes dessecados de *Senecio* spp. no feno de alfafa usado na alimentação dos bezerros. Um pool (total de 1 kg) de amostras de diferentes locais do estoque do milho quebrado que vinha sendo administrado aos bezerros foi colhido e enviado para análise por cromatografia de camada delgada para aflatoxina B₁ (AFB₁).

RESULTADOS

Há algum tempo, que não foi possível precisar, vários bezerros mostravam sinais pouco específicos de pelos arrepiados e mau desenvolvimento geral. Seis bezerros morreram dois a três dias após o agravamento desses sinais clínicos, com aparecimento de diarreia, dor abdominal, tenesmo, prolapso de reto e bruxismo.

Alterações de necropsia encontradas em três bezerros necropsiados incluíam fígado firme e castanho claro, marcados hidrotórax e ascite, edema translúcido e de aspecto gelatinoso do mesentério, mesocólon e das dobras da mucosa do abomaso.

Os principais achados histopatológicos, além da confirmação dos edemas observados macroscopicamente,

restringiam-se ao fígado. Fibrose portal que se estendia por entre os lóbulos e proliferação de ductos biliares (Fig.1) foram achados constantes. Os hepatócitos apresentavam moderada megalocitose e degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios. Muitos hepatócitos apresentavam glóbulos eosinofílicos no citoplasma (Fig.2). A tumefação dos hepatócitos obliterava a luz dos sinusóides. Necrose individual de hepatócitos e lesão venooclusiva (Fig.3) foram também frequentes.

A pesquisa por plantas que contêm alcaloides pirrolizidínicos no feno que era administrado aos animais resultou negativa. A análise do milho do alimento dos bezerros por cromatografia de camada delgada revelou 5.136ppb de AFB₁. Não foram pesquisados outros metabólitos de aflatoxina.

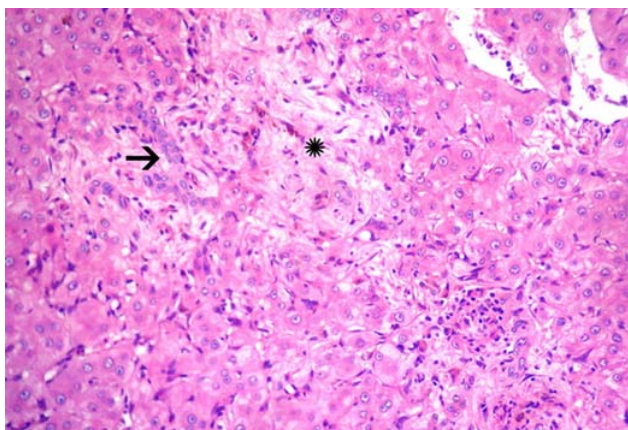


Fig.1. Fibrose portal (*) e proliferação de ductos biliares (seta) em bezerro com aflatoxicose crônica. HE, obj.20x.

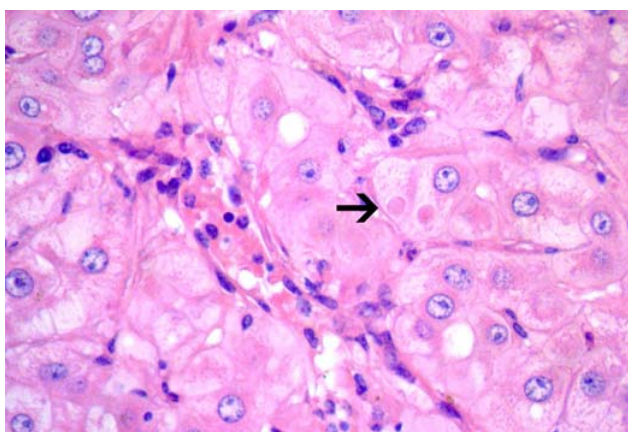


Fig.2. Alterações histológicas no fígado de bezerro com aflatoxicose crônica. Os hepatócitos apresentam moderada megalocitose e degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios. O aumento de volume dos hepatócitos oblitera a luz dos sinusóides. Em dois hepatócitos há glóbulos eosinofílicos (setas) no citoplasma. HE, obj.40x.

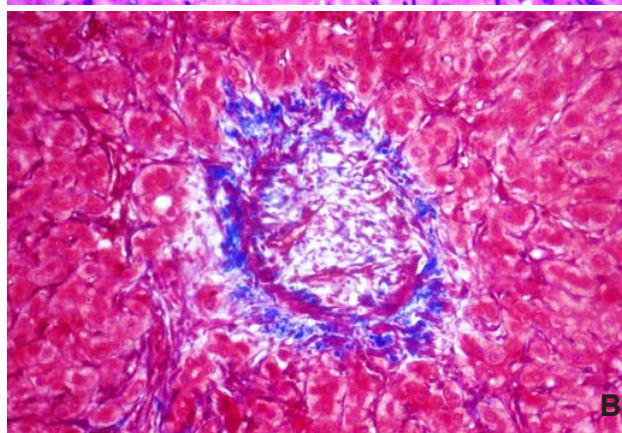
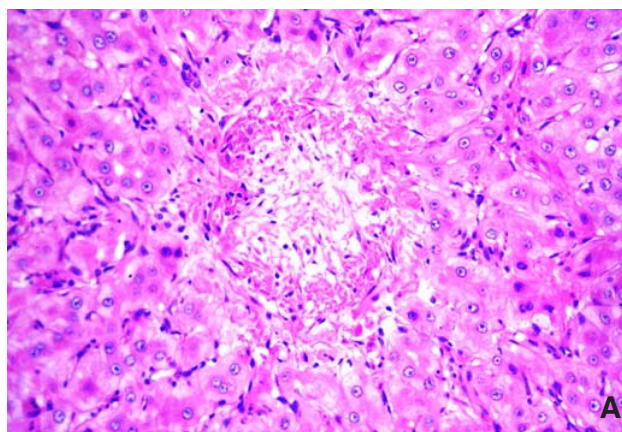


Fig.3. Lesão veno-oclusiva na aflatoxicose crônica em bezerros. (A) Tecido fibroso obstrui completamente a luz da veia hepática terminal. HE, obj.20x (B) Mesma lesão em espécime de fígado corado pelo Tricrômico de Masson, obj.20x.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de aflatoxicose neste estudo foi baseado nos sinais clínicos e lesões características apresentados pelos bezerros e nos altos níveis de AFB₁ encontrados em um dos componentes da alimentação dos bezerros. As lesões hepáticas encontradas nos bezerros deste relato foram consideradas crônicas em comparação com o que é descrito na literatura. Lesões crônicas de aflatoxicose são relatadas como contendo graus variáveis de proliferação do epitélio dos ductos biliares, fibrose, endoflebite obliterante (lesão venooclusiva) da veia centrolobular (veia hepática terminal), variação considerável no tamanho e forma dos hepatócitos e graus variáveis de esteatose hepatocelular (Loosmore & Markson 1961, Clegg & Bryson 1962, Hill 1963). Essas lesões foram observadas nos bezerros deste estudo.

A intoxicação por *Senecio* spp. ou por outras plantas que contenham alcaloides pirrolizidínicos deve ser incluída no diagnóstico diferencial de aflatoxicose, já que as alterações clínicas e anatomopatológicas nas duas condições são praticamente idênticas (Clegg & Bryson 1962, Stöber 1970, Pedugsorn et al. 1980) e já que a seneciose

é uma intoxicação comum em bovinos no Rio Grande do Sul (Rissi et al. 2007). No entanto, a possibilidade de ocorrência dessas plantas na dieta dos bezerros foi excluída e como os bezerros eram confinados não tinham acesso à pastagem.

Não é possível calcular com qualquer grau de precisão a quantidade de aflatoxina que cada bezerro deste estudo ingeria diariamente, pois embora 2kg/bezerro/dia de milho estivessem disponíveis, não se tem dados para confirmar se essa quantidade era realmente consumida. Não se sabe também se a aflatoxina era homoganeamente distribuída no milho oferecido aos bezerros. Na verdade, é pouco provável que esse fosse o caso e é sim provável que ocorressem porções de milho com maior ou menor quantidade de aflatoxina de que 5.136 ppb detectados na amostra analisada. Raciocinando, porém, com base na quantidade de AFB₁ (5.136ppb), que correspondia a 5,136mg/kg de milho, e levando em conta que cada bezerro pesava cerca de 100 kg e deveria consumir cerca de 2 kg/ração(milho)/dia, a dose diária de aflatoxina ingerida por cada bezerros seria 0,1mg/kg. Se as quantidades de aflatoxina provavelmente ingeridas pelos bezerros deste estudo forem comparadas às doses envolvidas nos surtos e experimentos descritos a seguir, será concluído que elas são suficientes para causar a intoxicação em bezerros.

Em um desses experimentos, cinquenta bezerros de 6-8 meses de idade, de raça de corte, foram divididos em cinco grupos de 10 animais cada, que receberam ração contendo 0, 100, 300, 700 e 1.000ppb de AFB₁ (Garret et al. 1968). A intoxicação foi observada em animais que receberam ração com 700ppb de AFB₁ ou mais. Nesses dois grupos houve redução do ganho de peso. Dois novilhos do grupo da ração com 1.000ppb de AFB₁ morreram no 59º e 137º dias do experimento e seus fígados eram fibróticos. Lesões hepáticas semelhantes foram observadas em um animal do grupo que recebia 1.000ppb e em outros dois animais do grupo de 700ppb que foram sacrificados aos 133 dias do experimento. Essas quantidades são pelo menos cinco vezes menores que as encontradas na ração ingerida pelos bezerros deste relato. Stöber (1970) menciona dados semelhantes aos de Garret et al. (1968) e afirma que após ingerirem torta de amendoim com 200-1.500ppb de AFB₁ bezerros jovens desenvolvem a intoxicação e Vaid et al. (1981) informam que níveis considerados perigosos na alimentação de bovinos estão entre 300-600ppm.

Em outro experimento (Lynch et al. 1970), em que bezerros ingeriram ração com aflatoxinas nas doses de 0,008 a 0,08mg/kg/dia de peso corporal/dia por seis semanas, observaram-se alterações nas enzimas de função hepática já nos animais que recebiam 0,02mg/kg/dia; os animais foram sacrificados e os de maior dosagem mostravam fibrose hepática. Alterações semelhantes ocorreram quando a aflatoxina foi administrada por via oral diluída em propilenoglicol e etanol. Os bezerros foram sacrificados após seis semanas e a maioria dos efeitos presentes da aflatoxicose ocorreu nas doses maiores (0,08 e 0,10mg/kg/dia).

Pier et al. (1976) administraram aflatoxina contida em cápsulas de gelatina a três bezerros nas doses de 0,1, 0,2 e 0,5mg/kg/dia. O bezerro que recebeu 0,5mg/kg/dia morreu no 14º dia do experimento e na necropsia foram encontrados icterícia, hemorragia e fibrose hepática associada a proliferação de ductos biliares. Lesões hepáticas semelhantes foram encontradas no bezerro que recebeu 0,2mg/kg/dia e que foi sacrificado no 32º dia do experimento. McKenzie et al. (1981) relataram um surto espontâneo com morte de 12 dentre um lote de 90 bezerros, 5-27 dias após ingerirem 0,3-0,7mg/kg/dia de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂). Nesses casos, essas doses mais elevadas levaram a alterações agudas, o que indica que o curso clínico é dependente da dose.

Bovinos jovens como o deste relato são mais suscetíveis à aflatoxicose do que bovinos adultos (Allcroft & Lewis 1963, Aust 1964, Lynch et al 1970, 1971, McKenzie et al. 1981, Colvin et al. 1984), mas a condição é também relatada em animais adultos (Vaid et al. 1981, Ray et al. 1986, Hall et al. 1989, Lafluf et al. 1989). Por outro lado, a intoxicação por aflatoxina em bovinos ocorre principalmente em animais confinados (Gopal et al. 1968, Colvin et al. 1984, Osweiler & Trampel 1985) e em animais de produção leiteira, como é o caso dos bezerros deste estudo. No entanto, há relatos de surtos ocasionais de aflatoxicose em bovinos que ingeriram milho não-colhido ou mal colhido ainda na lavoura (Sippel et al 1953, Hall et al. 1989).

Lesão venooclusiva hepática foi observada nos três casos deste estudo. A lesão consiste na obliteração de pequenas veias intra-hepáticas associadas à lesão do endotélio dos sinusóides, acúmulo de eritrócitos e fibrina no espaço subintimal (de Disse), e subsequente fibrose subendotelial (Stalker & Hayes 2007). Esse padrão de fibrose da veia centrolobular pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão portal e ser, pelo menos parcialmente, responsável pela ascite observada nos bezerros. Lesão venooclusiva tem sido relatada em bovinos afetados por aflatoxicose (Loosmore & Markson 1961, Clegg & Bryson 1962, Lynch et al. 1970, 1971), seneciose e em seres humanos após quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea (Stalker & Hayes 2007).

REFERÊNCIAS

- Allcroft R. & Lewis G. 1963. Groundnut toxicity in cattle: Experimental poisoning of calves and report on clinical effects in older cattle. *Vet. Rec.* 75:487-493.
- Aust S.D. 1964. Effects of feeding moldy corn to cattle. *Illinois Vet.* 7:10-12.
- Burnside J.E., Sippel W.L., Forgacs J., Carll W.T., Atwood M.B. & Doll E.R. 1957. A disease of swine and cattle caused by eating mold corn. II. Experimental production with pure cultures of molds. *Am. J. Vet. Res.* 18:817-824.
- Clegg F.G. & Bryson H. 1962. An outbreak of poisoning in store cattle attributed to Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* 74:992-994.
- Colvin B.M., Harrison L.R., Gosser H.S. & Hall R.F. 1984. Aflatoxicosis in feeder cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184:956-958.
- Garret W.N., Heitman H. & Booth A.N. 1968. Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127:188-190.

- Gopal T., Syed Z., Narayanaswamy M. & Premlata S. 1968. Aflatoxicosis in dairy cattle. *Indian Vet. J.* 45:707-712.
- Hall R.F., Harrison L.R. & Colvin B.M. 1989. Aflatoxicosis in cattle pastured in a field of sweet corn. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194:938.
- Hill K.R. 1963. Comment on the histological appearances in serial liver biopsies and post-mortem specimens. *Vet. Rec.* 75:493-494.
- Kellerman T.S., Coetzer J.A.W., Naudé T.W. & Botha C.J. 2005. *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town, p.3-6.
- Lafuf O., Termezana A., Rivero R., Riet Alvariza F., Feed O., Féola R., Diaz L., Gimenez G., Varela A., Camino A. & Uriarte G. 1989. Um caso de aflatoxicose em bovinos associado a maiz carbonoso. 17^a Jornadas Uruguayas de Buiatria. Pasandú, Uruguai, Seção cc 8, p.1-8.
- Loosmore R.M. & Markson L.M. 1961. Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* 73:813-814.
- Lynch G.P., Todd G.C., Shalkop W.T. & Moore L.A. 1970. Responses of dairy calves to aflatoxin-contaminated feed. *J. Dairy Sci.* 53:63-71.
- Lynch G.P., Shalkop W.T., Jakoby N.M., Smith D.F. & Miller R.W. 1971. Responses of dairy calves to oral doses of aflatoxin. *J. Dairy Sci.* 54:1688-1698.
- McKenzie R.A., Blaney B.J., Connole M.D. & Fitzpractick A. 1981. Acute aflatoxicosis in cattle fed peanut hay. *Aust. Vet. J.* 57:284-286.
- Oswieiller G.D. & Trampel D.W. 1985. Aflatoxicosis in feedlot calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 6:636-637.
- Patterson D.S.P. & Anderson P.H. 1982. Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet. Rec.* 110: 60.
- Pedugsorn C., Promma S., Ratanacchot P. & Rietschel W. 1980. Chronic aflatoxicosis in cattle on an animal breeding station in North Thailand. *Animal Research and Development* 11:106-111.
- Pier A.C., Cysewski S.J., Richard J.L., Baetz A.L. & Mitchell L. 1976. Experimental mycotoxicosis in calves with aflatoxin, ochratoxin, rubratoxin and T-2 toxin. *Proc. 80th Annu. Meeting US. Anim. Hlth Assoc.* 130-148.
- Ray A.C., Abbott B., Colter S.R., Murphy M.J., Reagor J.C., Robinson R.M., West J.E. & Whitford H.W. 1986. Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188:1187-1188.
- Richard J.L., Pier A.A., Stubblefield R.D., Shotwell O.L., Lyon R.L. & Cutlip R.C. 1983. Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissues residues in steers. *Am. J. Vet. Res.* 44:1294-1299.
- Rissi D.R., Rech R.R., Pierezan F., Gabriel A.L., Trost M.E., Brun J.S., Komnens G.D. & Barros C.S.L. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 27:261-268.
- Sastry G.A., Narayana J.V., Rama Rao P., Christopher J & Hill K. 1965. A report on the groundnut toxicity in Murrah buffaloes in Andhra Pradesh (India). *Indian Vet J.* 42:79.
- Schoental R. 1967. Aflatoxins. *Ann. Rev. Pharmacol.* 7:343-353.
- Sippel W.L., Burnside J.E. & Atwood M.B. 1953. A disease of swine and cattle caused by eating mold corn. *Proceedings. 90th Annu. Meet. Am. Vet. Med. Assoc.* p.174-181.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system, p.297-388. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Stöber M. 1970. Aspergillotoxikose, p.1240-1242. In: Rosemberger G. (Ed.), *Krankheiten des Rindes*. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Vaid J., Dawra R.K., Sharma O.P. & Negi S.S. 1981. Chronic aflatoxicosis in cattle. *Vet. Human Toxicol.* 23:436-438.
- Van Halderen A., Green J.R., Marasas W.F.O., Thiel P.G. & Stockenstrom S. 1989. A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the Western Cape Province. *J. South Afr. Vet. Assoc.* 60:210-211.

4 ARTIGO 2

Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros

Felipe Pierezan, José Carlos Oliveira-Filho, Priscila M. Carmo, Adelina R. Aires, Marta L.R. Leal, Tatiana M. Souza, Carlos A. Mallmann e Claudio S.L. Barros

Publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

v.32, n.7, p.607-618, 2012

DOI: 10.1590/S0100-736X2012000700004

Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros¹

Felipe Pierezan², José Carlos Oliveira-Filho², Priscila M. Carmo², Adelina R. Aires³,
Marta L.R. Leal³, Tatiana M. Souza⁴, Carlos A. Mallmann⁵ e Claudio S.L. Barros^{6*}

ABSTRACT.- Pierezan F, Oliveira Filho J.C., Carmo P.M., Aires A.R., Souza T.M., Mallmann C.A. & Barros C.S.L. 2012. [Experimental aflatoxin poisoning in calves.] Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(7):607-618. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: claudioslbarros@uol.com.br

Two experiments were performed in order to determine the toxic effects of varying doses of aflatoxins in calves. Clinical, productive and pathologic aspects of affected calves were considered. In the first experiment, nine 2 to 4-month-old calves Holstein Friesian calves were fed, for two months, daily amounts corresponding to 1.5% of their body weight of a ration containing 500±100 ppb of aflatoxins. Three calves of similar age and weight were used as controls and, except for being a ration free of aflatoxins, were kept in the same condition as the treated calves. In the second experiment, three 4-5-month old Holstein Friesian calves, were orally fed daily small parcels of a concentrate of aflatoxins diluted in 500 ml of water corresponding to 1,250, 2,500 e 5,000 ppb of B1 aflatoxin (AFB1). A male 4-month-old Holstein Friesian calf was used as control. During all the experimental period of the first experiment, the weight gain of the calves receiving AFB1 was equivalent to that of the control group. In the first experiment no differences were observed between treated and control calves when the values of serum activity of aspartate transaminase (AST), serum albumin (SA), total serum protein (TP), and PVC, determined weekly, were compared. However there was a significant difference between treated and control groups in the serum activities of alkaline phosphatase (AP) and gamma glutamyl transferase when the serum sampled on the 63th day of the experiment was considered. During the whole experimental period and up to three weeks after the final of the experiment, no clinical signs or histopathological changes associated with the consumption of aflatoxins were observed in any of the calves of the first experiment. In the second experiment, clinical signs observed in three treated calves included loss of appetite, decrease in weight gain, and loss of weight. Jaundice, intermittent diarrhea, tenesmus and apathy were only observed in the calf receiving 5,000 ppb of AFB1. Due to these clinical signs the calf was euthanized. Increased activity of AF and GGT were observed in all the calves of the treated group during most part of the experimental period. A marked drop in the serum levels of SA was observed in the serum sampled on the 49^o day of the experiment in the calf receiving the largest dose of aflatoxin. No changes were observed regarding PCV, TP, total bilirubin, direct bilirubin and in the serum activity of AST in any of the calves of the second experiment. Histopathological changes in intoxicated calves included bile duct proliferation, cytoplasmic vacuolar hepatocelular degeneration consistent with hepatocelular deposit of lipids, periportal to brid-

¹ Recebido em 29 de dezembro de 2011.

Aceito para publicação em 26 de janeiro de 2012.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Financiada pelo CNPq, Projeto Universal 473493/2010-1.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³ Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Animal, Departamento de Grandes Animais, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

⁴ Bolsista do Programa Nacional de Pós Doutorado (PNPD) da CAPES junto ao projeto Aflatoxicose em Bovinos, Departamento de Patologia, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

⁵ Laboratório de Análises Micotoxológicas, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

⁶ Departamento de Patologia, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. *Pesquisador 1A do CNPq. Autor para correspondência: claudioslbarros@uol.com.br

ging fibrosis, megalocytosis, subendothelial edema and fibrosis in terminal hepatic veins. Necropsy findings in the euthanatized calf which receive de largest doses of AFB1 included slight enlargement of the liver which was firm and diffusely light-yellow, mild ascites, and edema of the mesentery and of abomasal folds. Data stemmed from these two experiments allow to conclude that AFB1 doses of 500±100 in the ration do not cause pathologic changes or decrease in productivity in calves kept in experimental conditions, but can be associated to minimal serum biochemistry; while AFB1 doses of 1.250, 2.500 e 5.000 ppb in the ration cause chronic hepatic disease in calves in kept in experimental conditions.

INDEX TERMS: Diseases of cattle, mycotoxicosis, aflatoxina, aflatoxicosis, hepatic diseases, pathology.

RESUMO.- Foram realizados dois experimentos para determinar os efeitos tóxicos de diferentes doses de aflatoxinas em bezerros, considerando-se aspectos clínicos, produtivos e patológicos. No primeiro experimento, nove bezerros, Holandês, com 2-4 meses de idade, receberam ração contendo 500±100 ppb de aflatoxina, na quantidade equivalente a 1,5% do peso vivo/dia, durante dois meses. Três bezerros de idade e peso semelhantes foram usados como controle e, exceto por terem recebido ração livre de aflatoxinas, foram mantidos nas mesmas condições. No segundo experimento, três bezerros, Holandês, com 4-5 meses de idade, receberam, por via oral, pequenas porções diárias de um concentrado de aflatoxinas, diluídas em 500ml de água, correspondendo a doses de 1.250, 2.500 e 5.000 ppb de aflatoxina B1 (AFB1). Um bezerro, Holandês, 4 meses, macho, foi usado como controle. No primeiro experimento, o ganho de peso dos bezerros recebendo AFB1 foi equivalente ao do grupo controle durante todo período experimental. Nesse experimento não foram observadas alterações na atividade sérica da enzima aspartato transaminase (AST), nos níveis da albumina sérica (AS), da proteína total (PT) e no hematócrito, quando comparados os resultados semanais do grupo tratamento e controle. No entanto, observou-se diferença significativa nas atividades séricas das enzimas fosfatase alcalina (FA) e gama glutamyl transferase (GGT) entre o grupo tratamento e o grupo controle, na coleta do 63º dia do experimento. Durante o período experimental, e três semanas após o término desse período, não foram observados sinais clínicos e alterações histopatológicas associadas ao consumo de aflatoxinas, em qualquer dos bezerros do grupo tratamento do primeiro experimento. No segundo experimento, sinais clínicos observados nos três bezerros intoxicados incluíram perda de apetite, diminuição do ganho de peso e emagrecimento. Icterícia, diarreia intermitente, tenesmo e apatia severa, foram observadas apenas no bezerro que recebia 5.000 ppb de AFB1. Esses sinais clínicos foram a razão para eutanásia desse bezerro. Níveis alterados da atividade sérica de FA e GGT foram observados em todos os bezerros do grupo tratamento durante grande parte do período experimental. Queda acentuada do nível da AS sérica foi observada na coleta do 49º dia do experimento no bezerro que recebia a maior dose de aflatoxina. Não foram observadas variações no hematócrito e na atividade sérica da AST, nem nos níveis séricos de proteína total, bilirrubina total e bilirrubina direta em qualquer dos bezerros desse experimento. Alterações histopatológicas nos bezerros intoxicados incluíram proliferação de ductos biliares, degeneração citoplasmática

vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios, fibrose periportal, ou em ponte, megalocitose, fibrose subendotelial das veias hepáticas terminais e edema. Achados de necropsia do bezerro recebendo a maior dose de AFB1 incluíram fígado levemente aumentado de tamanho, difusamente amarelo-claro e firme, discreta ascite, edema de mesentério e submucosa do abomaso. Os dados obtidos nesses experimentos permitem afirmar que doses de 500±100 ppb de AFB1 não causam alterações patológicas e produtivas em bezerros em condições experimentais, mas podem estar associadas à mínimas alterações bioquímicas, enquanto doses de 1.250, 2.500 e 5.000 ppb de aflatoxina B1 causam doença hepática crônica em bezerros em condições experimentais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, micotoxicose, aflatoxina, aflatoxicose, doenças hepáticas, patologia.

INTRODUÇÃO

Aflatoxicose é uma doença hepática aguda, subaguda ou crônica de humanos e animais, causada por aflatoxinas, metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Esses fungos ubíquos e saprofitos crescem em uma ampla variedade de grãos, rações para animais e alimentos para consumo humano, como amendoim, milho, algodão, sorgo, girassol, arroz e nozes. As quatro principais aflatoxinas são B₁, B₂, G₁ e G₂; e, dessas, a aflatoxina B₁ é a mais comum e a mais tóxica (Kellerman et al. 2005).

A doença já foi documentada em humanos, primatas não-humanos, gatos, cães, roedores, aves, bovinos e búfalos pela ingestão de alimento contendo aflatoxina (Sastry et al. 1965, Vaid et al. 1981, Hussein & Brasel 2001). A toxicidade das aflatoxinas varia dependendo da espécie animal considerada. Ruminantes estão entre os mais resistentes, uma vez que aflatoxinas são parcialmente degradados pela microbiota ruminal (Hussein & Brasel 2001, Yiannikouris & Jouany 2002). Assim, bovinos são classificados como medianamente sensíveis e ovinos como resistentes a aflatoxinas (Kellerman et al. 2005).

Surtos documentados de aflatoxicose em bovinos são raros. Nessa espécie, a doença geralmente não é tão fulminante quanto em suínos e segue um curso crônico ou subagudo após a exposição à aflatoxina por várias semanas ou meses (Kellerman et al. 2005), mas casos agudos já foram relatados em bovinos (McKenzie et al. 1981, Lafluf et al. 1989). A doença foi reproduzida em bovinos pela administração de doses orais de aflatoxina ou por administração de alimentos conta-

minados por aflatoxina (Allcroft & Lewis 1963, Garret et al. 1968, Lynch et al. 1970, Pier et al. 1976, Patterson & Anderson 1982, Richard et al. 1983). No entanto, diferenças significativas nas doses consideradas como tóxicas para bovinos, assim como discrepâncias leves nas formas clínicas e achados patológicos dessa doença, são frequentes entre os vários estudos. A evolução das lesões hepáticas foi investigada em apenas um desses estudos experimentais, no qual as quantidades de aflatoxina ingeridas pelos bovinos não eram conhecidas (Allcroft & Lewis 1963). Os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de um surto de doença hepática crônica em bezerros do Rio Grande do Sul, associada à ingestão de aflatoxina, foram recentemente relatados (Pierezan et al. 2010). Esses achados, em comparação com aqueles observados em outros surtos naturais e estudos experimentais descritos na literatura sobre essa doença, indicavam que era necessário um estudo sistemático para esclarecer vários pontos da intoxicação crônica por aflatoxina em bovinos.

O objetivo deste trabalho foi descrever o resultado de experimentos realizados para determinar a influência de diferentes doses de aflatoxina sobre a produtividade de bezerros e os aspectos clínicos e patológicos da intoxicação nesses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação e métodos de administração da toxina

Dois experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria. No primeiro, foram utilizados doze bezerros, machos, Holandês, com 2-4 meses de idade e pesos entre 44-93 kg. No período experimental (63 dias), os bezerros receberam ração contendo 18% de proteína, constituída por farelo de milho livre de aflatoxinas, farelo de soja, calcário calcítico e premix vitamínico. A quantidade de ração (equivalente a 1,5% do peso vivo por dia) foi ajustada semanalmente de acordo com o peso dos bezerros. Na ração de nove bezerros do grupo tratamento foram adicionadas pequenas porções de um concentrado de aflatoxina B1 (AFB1), para obtenção de um nível médio de 500 ppb de AFB1. A

adição de concentrado de toxina às rações foi realizada usando-se um misturador vertical. As rações assim preparadas foram homogeneizadas por cerca de 10 minutos e acondicionadas por um período mínimo de três dias, para a uniformização da mistura. Três bezerros serviram como controle e receberam somente ração livre de aflatoxinas.

No segundo experimento foram utilizados quatro bezerros, machos, Holandês, com 4-5 meses de idade e pesos entre 92,8-145,8 kg. Durante o período experimental (63 dias), os bezerros receberam a mesma ração livre de aflatoxinas utilizada no primeiro experimento. A quantidade de ração (1,5% do peso vivo) foi ajustada semanalmente. Os bezerros do grupo tratamento receberam diariamente, por via oral e diluídas em 500 mL de água, porções de um concentrado de AFB1 (arroz moído contendo altos níveis de aflatoxina), nas doses correspondente a 1.250, 2.500 e 5.000 ppb de AFB1. A quantidade de concentrado de toxina foi ajustada semanalmente conforme o aumento da quantidade de ração ingerida. Um bezerro, Holandês, 4 meses, macho, 137,8 kg, foi usado como controle.

Os bezerros utilizados em ambos experimentos foram everminados e mantidos em baias individuais por duas semanas antes do início dos experimentos para adaptação às instalações e a alimentação. Diariamente, as baias eram limpas e os animais avaliados quanto ao estado geral e o apetite. Durante todo experimento os bezerros de ambos experimentos receberam feno de tifton à vontade. Dados gerais dos bezerros e doses utilizadas nos experimentos são demonstradas no Quadro 1. - Amos experimentos foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da UFSM (Porcesso 23081.006997/2010-34).

Método de produção da toxina

O concentrado de AFB1 foi produzida pelo Instituto de Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas (SAMITEC), a partir da cepa NRLL 2999 de *Aspergillus parasiticus* por fermentação em arroz parboilizado, de acordo com o anteriormente descrito (Shotwel et al. 1966).

Bioquímica sérica e métodos em clínica e patologia

Em ambos os experimentos os animais foram pesados semanalmente para obtenção da média de ganho de peso por dia. Para realização de eritrograma e exames bioquímicos, 10mL de sangue foram coletados da jugular de todos os bezerros antes da admi-

Quadro 1. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Dados dos bovinos utilizados nos dois experimentos, quantidades de toxina fornecida e modo de administração

Bezerro	Idade (meses)	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Dose AFB 1 (ppb)	Modo de administração
1 ^a	3	67.9	83.8	500±100	MR ^b
2 ^a	3	62.5	79.7	500±100	MR
3 ^a	4	88.1	110.2	500±100	MR
4 ^a	3	70.5	85.6	500±100	MR
5 ^a	4	81.9	95.8	500±100	MR
6 ^a	3	71.9	84.4	500±100	MR
7 ^a	4	86.1	115	500±100	MR
8 ^a	4	93.5	120.1	500±100	MR
9 ^a	3	71.4	99.6	500±100	MR
10 ^{ac}	4	82.0	111	0	MR
11 ^{ac}	2	44.5	63.7	0	MR
12 ^{ac}	4	79.9	102.3	0	MR
13 ^d	4	92.8	107.2	1250	DA ^e
14 ^d	5	135.8	135	2500	DA
15 ^d	5	145.8	137.6	5000	DA
16 ^{dc}	5	138.7	161	0	DA

^a Experimento 1, ^b misturada à ração, ^c controle, ^d experimento 2, ^e diluída em água.

nistração da toxina (dia zero) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 49 e 63 após o início da ingestão da toxina. Para o eritrograma foram utilizados 5mL de sangue acondicionado em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para realização de exames bioquímicos, que incluíam a determinação da atividade sérica das enzimas aspartato-aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), e níveis de proteína totais (PT), albumina sérica (AS), bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD), foram utilizados 5ml de sangue acondicionado em tubos sem anticoagulante. As contagens sanguíneas foram realizadas em contadores celulares automatizados através do princípio da impedância elétrica. Os exames bioquímicos foram realizados sob automatização, por métodos cinéticos (AST e GGT) ou colorimétricos (FA, BT e BD) através de química seca. A análise dos níveis de proteínas totais e albumina no soro foi realizada pelo método de biureto e verde de bromocresol, respectivamente.

Biópsias hepáticas foram realizadas semanalmente, para coleta de amostras destinadas a análise histopatológica. A área escolhida para as punções localizava-se no 11^o espaço intercostal direito cerca de 20cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de duas linhas imaginárias: uma da tuberosidade do íleo à escápula e outra perpendicular ao 11^o espaço intercostal. A técnica para punção consistiu de: 1) tricotomia e anti-sepsia da região; 2) anestesia local (pele ao peritônio) com 5ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor; 3) perfuração da pele e músculo com agulha 40x20mm; 4) e punção do fígado utilizando-se uma agulha de Menghini (Barros et al. 2007). Os tecidos obtidos nas biópsias hepáticas e fragmentos de órgãos de um bezerro submetido a eutanásia foram fixados em formol a 10%, processados e corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina.

Os resultados dos exames bioquímicos e ganho de peso dos bezerros do primeiro experimento foram submetidos à análise variância (ANOVA) seguido pelo teste t (Silva & Azevedo 2002). O nível de significância foi fixado em $P < 0.05$.

RESULTADOS

Sinais clínicos e achados da bioquímica sérica

Não foram observados sinais clínicos e alterações no ganho de peso (Fig.1) nos nove bezerros que receberam doses diárias de 500 ± 100 ppb de aflatoxina, durante os 63 dias de experimento e nas avaliações realizadas até três semanas após o término desse período. Nesse primeiro experimento, não foi observada diferença significativa no hematócrito e nos níveis da AS e PT e da atividade sérica de AST durante o período experimental, quando comparados os resultados semanais e quinzenais do Grupo controle e do Grupo tratamento. Esses parâmetros permaneceram dentro dos valores normais de referência, durante todo período experimental, nos bezerros de ambos os grupos. Os níveis das enzimas séricas FA e GGT também foram semelhantes nas aferições semanais para ambos os grupos, durante grande parte do experimento, porém, aumento significativo ($P < 0.05$) dos níveis dessas enzimas foi observado na última coleta do período experimental (63^o dia). Os valores referentes aos eritogramas e bioquímica sérica dos bezerros do primeiro experimento são demonstrados na Figura 2.

No segundo experimento, sinais clínicos associados à intoxicação foram observados a partir do 10^o, 23^o e 42^o dias de experimento, nos bezerros recebendo 5.000, 2.500 e 1.250 ppb de AFB1, respectivamente, e incluíam, inicial-

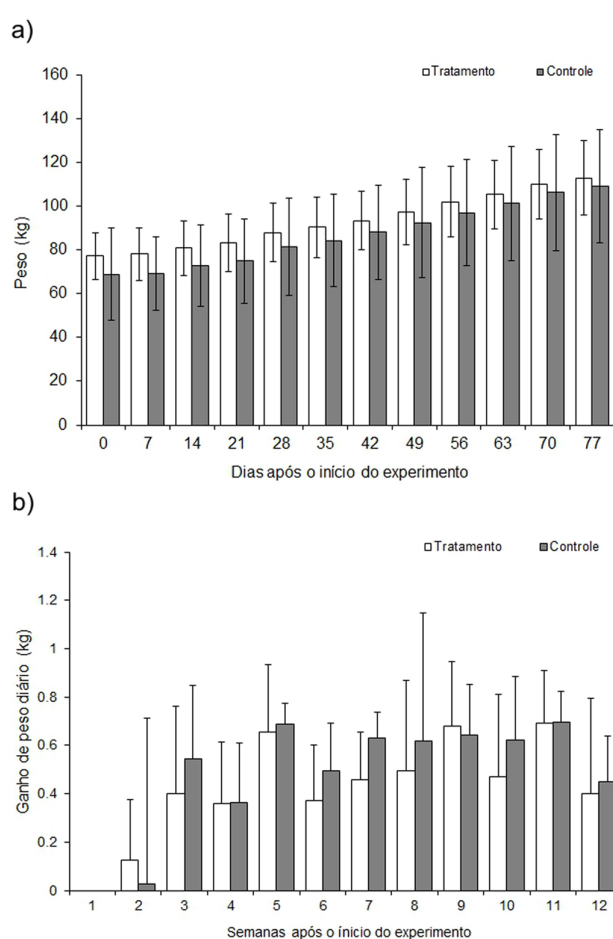


Fig.1. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Representação gráfica do peso médio semanal e ganho de peso semanal dos bezerros dos grupos controle e tratamento do primeiro experimento.

mente, perda de apetite, seguida de diminuição do ganho de peso e emagrecimento (Fig.3). Diminuição do ganho de peso foi avaliada pela comparação do ganho de peso dos bezerros intoxicados com o peso do bezerro controle ou, então, com ganho de peso médio dos bezerros controle do primeiro experimento. Mesmo que oscilações entre ganho e perda de peso tenham sido observadas em todos os bezerros desse segundo experimento, incluindo o animal controle, nas primeiras semanas de ingestão da toxina, a diminuição do ganho de peso dos animais do grupo tratamento foi melhor observada nas pesagens do 14^o e 28^o dias de experimento nos bezerros recebendo 5.000 ppb e 2.500 ppb, respectivamente. Esses mesmos bezerros apresentaram acentuada perda de peso nas pesagens do 21^o e 49^o dias de experimento, respectivamente. Sinais clínicos considerados terminais, caracterizados por diarreia (Fig.4A), tenesmo (Fig.4B), icterícia e apatia severa, foram observados apenas no bezerro recebendo 5.000 ppb, a partir do 40^o dia de experimento, e foram a razão para eutanásia desse bezerro no 60^o dia de experimento.

Alterações na bioquímica sérica dos bezerros no segundo experimento foram representadas por níveis anormais

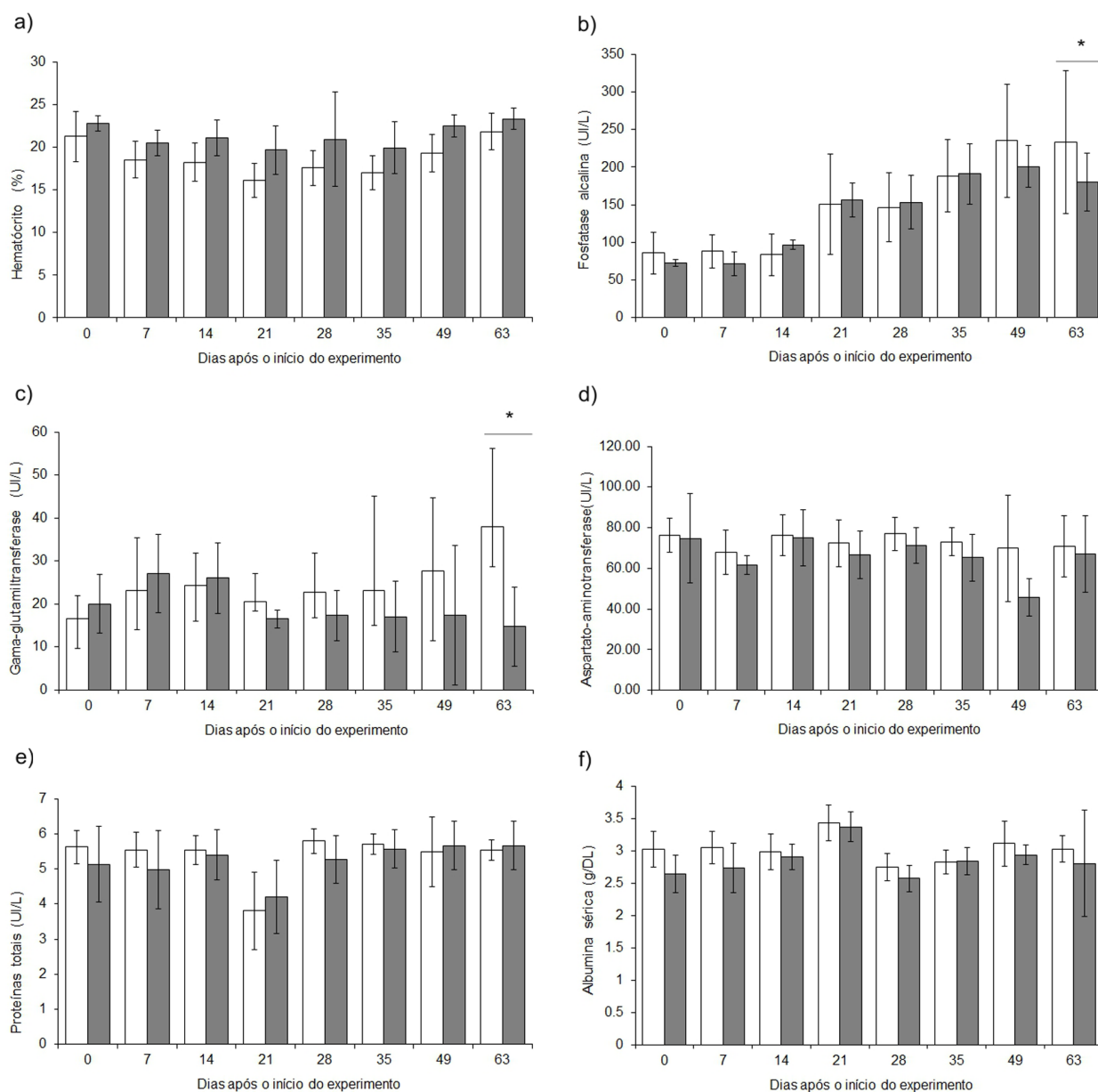


Fig.2. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Representação gráfica do hematócrito e parâmetros da bioquímica sérica dos bezerros dos grupos controle e tratamento do primeiro experimento.

da enzima FA e GGT. Níveis acima dos valores normais de referência para a enzima FA foram observados a partir da coleta do 14^o dia de experimento nos bezerros recebendo 2.500 e 5.000 ppb de AFB1 e 28^o dia de experimento no bezerro recebendo 1.250 ppb de AFB1. Níveis anormais da enzima GGT foram observados a partir do 14^o dia de experimento nos três bezerros do grupo tratamento. Os níveis dessas duas enzimas aumentaram gradativamente nas coletas subsequentes até o término do experimento. O nível de AS nos bezerros desse experimento permaneceu dentro dos valores normais de referência durante a maior parte do período experimental, porém, na coleta do 49^o dia de experimento foi observada queda acentuada do nível des-

sa proteína no bezerro recebendo 5.000 ppb de AFB1. Não foram observadas anormalidades no hematócrito e nos níveis da atividade sérica da AST, nem nos níveis de BT, BD e PT desses bezerros, durante todo período experimental. Os valores referentes aos pesos e bioquímica sérica dos bezerros do segundo experimento estão no Quadro 2.

Achados de necropsia e histopatológicos

Durante todo período experimental, e três semanas após o término do experimento, não foram observadas alterações histopatológicas que pudessem estar associadas à ingestão de aflatoxinas, nas biópsias hepáticas dos bezerros do primeiro experimento.

Quadro 2. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros (Experimento 2). Pesagens e achados da bioquímica sérica observados nos três bezerros intoxicados e num bovino controle

Parâmetro	Bov.	Dias de após o início do experimento									
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Peso (kg) ^a	1 ^b	138,7	139,5	139,4	145,5	149,2	155,5	160	161	163,5	165
	2 ^c	92,8	93,5	96,5	97,1	96,9	101,5	105,7	107,2	107,2	108
	3 ^d	135,8	136,0	135,6	137	137,2	139	140,7	135	134,1	133,3
	4 ^e	143,8	144,5	144,9	141,9	141,5	141,5	141,2	137,6	-	-
	FA ^f (0,0-160,0 UI/L)	1	79	79	97	90	84	91	114	109	98
	2	93	107	136	146	213	293	268	208	269	-
	3	152	156	189	296	365	427	396	400	307	-
	4	132	123	164	378	543	568	555	560	-	-
GGT ^g (20,0-27,0 UI/L)	1	13	12	15	14	18	13	17	16	18	-
	2	19	19	29	44	93	122	129	101	89	-
	3	15	23	30	60	157	178	198	211	173	-
	4	16	22	68	226	340	318	226	200	-	-
	AST ^h (40,0-130,0 UI/L)	1	65	51	64	42	56	68	62	68	73
2		92	97	86	77	76	71	75	85	77	-
3		60	70	67	116	98	104	81	71	82	-
4		61	79	96	112	90	52	63	69	-	-
PT ⁱ (6,7-7,5 UI/L)		1	6,5	6,1	6,3	5,9	6,3	5,8	6,4	6,4	5,8
	2	4,8	5,0	5,6	6,0	6,1	6,1	6,1	5,7	5,6	-
	3	5,4	5,1	5,6	5,5	5,8	6,1	5,9	6,0	6,2	-
	4	5,9	6,0	6,5	6,1	6,5	6,2	6,0	6,6	-	-
	AS ^j (2,5-3,5 g/DL)	1	2,6	2,5	2,6	2,4	2,4	2,4	2,6	2,7	2,6
2		2,5	2,8	2,7	2,6	2,6	2,8	2,8	2,7	2,6	-
3		3,0	2,5	2,9	3,1	3,0	2,8	2,8	3,0	2,8	-
4		3,0	2,9	3,0	2,8	2,8	2,7	2,5	0,4	-	-
BT ^k (0,01-3,20 mg/DL)		1	1,69	1,74	1,7	1,8	1,78	1,73	1,63	1,74	1,81
	2	1,8	1,69	1,7	1,7	1,7	1,77	1,81	1,85	1,80	-
	3	1,59	1,68	1,86	1,79	1,89	1,14	1,11	1,05	1,14	-
	4	1,26	1,18	1,21	1,15	1,11	1,64	1,92	2,01	-	-
	BD ^l (0,04-0,44 mg/DL)	1	0,08	0,1	0,07	0,04	0,05	0,02	0,19	0,1	0,06
2		0,10	0,08	0,23	0,05	0,09	0,17	0,15	0,1	0,16	-
3		0,35	0,04	0,16	0,09	0,02	0,07	0,07	0,16	0,26	-
4		0,01	0,04	0,07	0,10	0,09	0,24	0,5	0,04	-	-

^a Os números entre parênteses após o nome do parâmetro são os valores de referência; ^b bezerro controle; ^c bezerro 1250 ppb; ^d bezerro 2500 ppb; ^e bezerro 5000 ppb; ^f fosfatase alcalina; ^g gama glutamil transferase; ^h aspartato amino transferase; ⁱ proteínas totais; ^j albumina sérica; ^k bilirrubina total; ^l bilirrubina direta.

Na análise histopatológica das biópsias hepáticas dos bezerros do segundo experimento a lesão mais precocemente observada caracterizava-se por macro e microvacúolos intracitoplasmáticos, isolados ou múltiplos (degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios) principalmente em hepatócitos da região centrolobular. Essa lesão foi observada nas biópsias hepáticas do 14^o dia de experimento no bezerro recebendo 5.000 ppb de AFB1 e 21^o dia de experimento nos bezerros recebendo 1.250 e 2.500 ppb de AFB1. No entanto, diminuição da severidade até completo desaparecimento dessas lesões foi observadas nas biópsias das duas semanas subsequentes. Proliferação de ductos biliares foi observada a partir da biópsia hepática realizada no 28^o dia de experimento nos bezerros recebendo 1.250 ppb e 5.000 ppb, e 35^o dia de experimento, no bezerro recebendo 2.500 ppb. Inicialmente, essa lesão era observada

como pequenos agregados de células cuboidais epiteliais, formando estruturas semelhantes a ductos, frequentemente sem lúmen central, concentrados ao redor de espaços porta. Nas biópsias hepáticas subsequentes essas lesões foram observadas com maior intensidade e frequência, não só em torno de espaços porta, mas estendendo-se para regiões mediozonais. Essas duas lesões foram seguidas por fibrose, observada principalmente ao redor de espaços porta e ductos biliares neoformados, observadas nas biópsias hepáticas coletadas a partir do 35^o (1.250 e 5.000 ppb) e 42^o dias de experimento (2.500 ppb), além de megalocitose discreta e edema. As biópsias subsequentes revelaram aumento progressivo das áreas de fibrose, principalmente ao redor de espaços porta, com evolução pra fibrose em ponte (Fig.5). Posteriormente ao estabelecimento das áreas de fibrose e proliferação de ductos, principalmente nas últimas biópsias hepáticas de todos os bezerros desse experimen-

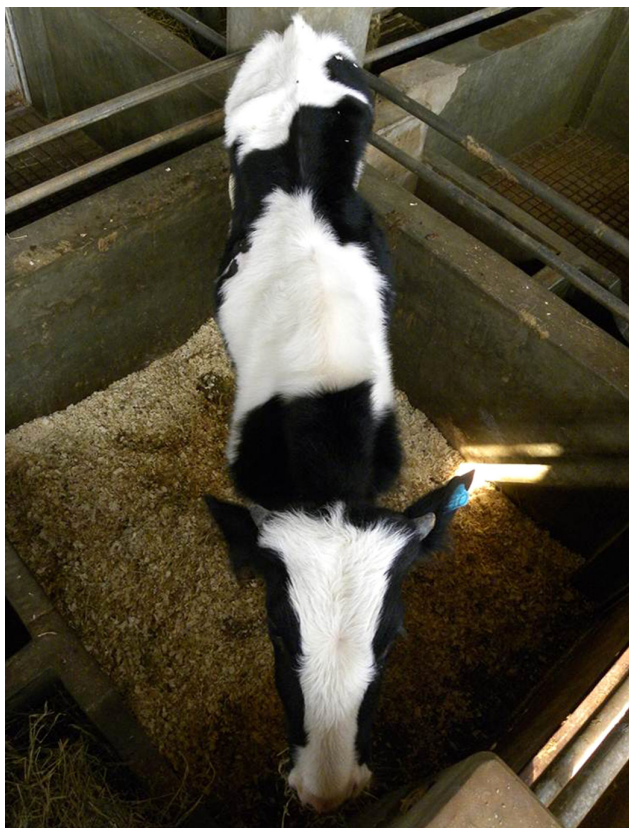


Fig.3. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1 apresentando baixo escore corporal (2-5), evidenciado por proeminentes íleo, ísquio, processos transverso das vértebras, e redução das massas musculares dos membros

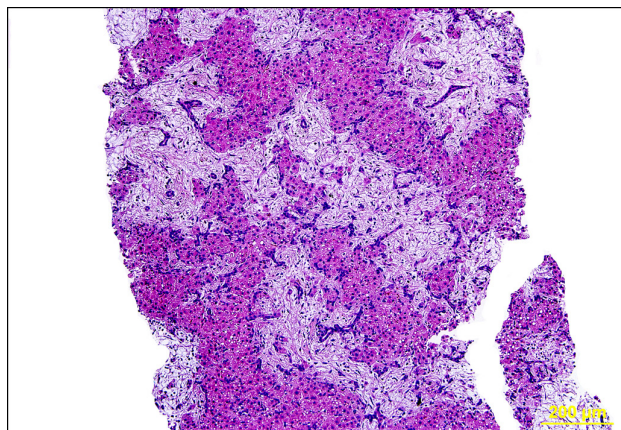


Fig.5. Alterações histológicas na biópsia hepática do 42º dia de experimento do bezerro que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1. Observam-se áreas focalmente extensivas de fibrose e proliferação de ductos biliares, concentradas principalmente ao redor de espaços porta e, ocasionalmente, conectando um ducto ao outro. Os feixes de colágeno estão levemente separados por edema. HE, obj.10x.

to, observou-se degeneração citoplasmática hepatocelular vacuolar, consistente com acúmulo de lipídios, ocorrendo em grupos de hepatócitos em meio ao parênquima remanescente.

Na necropsia do bezerro que recebeu a maior dose de AFB1, observou-se um baixo escore corporal enquadrado no Grau 1 na classificação de estado corporal adotada (Stöber et al. 1990), o que era evidenciado pelo escasso tecido adiposo subcutâneo e abdominal e diminuição do volume das grandes massas musculares dos membros, lombo e quadril. O fígado estava levemente aumentado de volume,



Fig.4. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Sinais clínicos (A) Bezerro que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1 com diarreia líquida e esverdeada. (B) Mesmo bezerro apresentando tenesmo.

difusamente amarelo-claro e firme (Fig.6 e 7); havia ascite discreta e moderado edema do mesentério e da submucosa do abomaso (Fig.8). A vesícula biliar desse bezerro estava acentuadamente distendida por bile. Histologicamente, a lesão no fígado caracterizava-se por acentuada perda do padrão lobular devido à substituição de aproximadamente metade do parênquima hepático por ductos biliares proliferados, circundados por abundante tecido fibroso, composto por feixes finos de colágeno, arranjados frouxamente e separados por quantidades variáveis de material basofílico pálido homogêneo (edema) (Fig.9 e 10). Esses agregados de tecido fibroso estavam concentrados predominantemente ao redor de espaços porta e, ocasionalmente, conectavam um espaço a outro (fibrose em ponte) (Fig. 9). Múltiplos agregados de hepatócitos apresentando degeneração citoplasmática vacuolar (Fig.11), consistente com acumulação hepatocelular de lipídios, e raros hepatócitos com núcleos aumentados duas a três vezes de tamanho (megalocitose) (Fig.12) eram observados distribuídos aleatoriamente pelo parênquima hepático

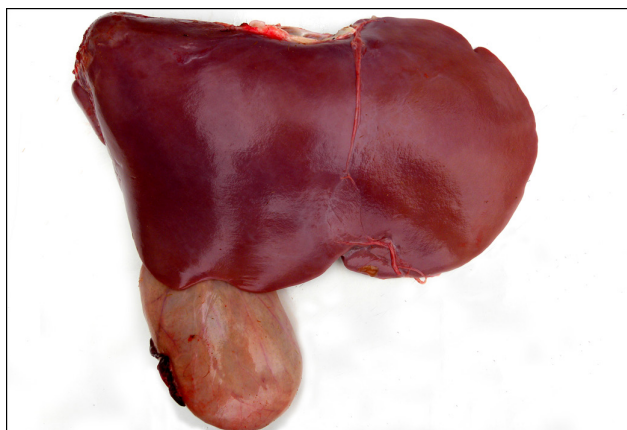


Fig.6. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1. Observa-se o fígado levemente aumentado de tamanho e difusamente amarelo-claro e firme; a vesícula biliar está acentuadamente distendida por bile.



Fig.7. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1. A superfície de corte está difusamente amarelo-clara.

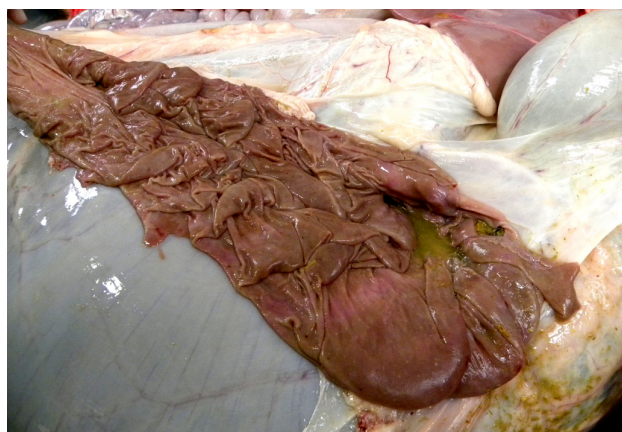


Fig.8. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1. Observa-se moderado edema das pregas do abomaso.

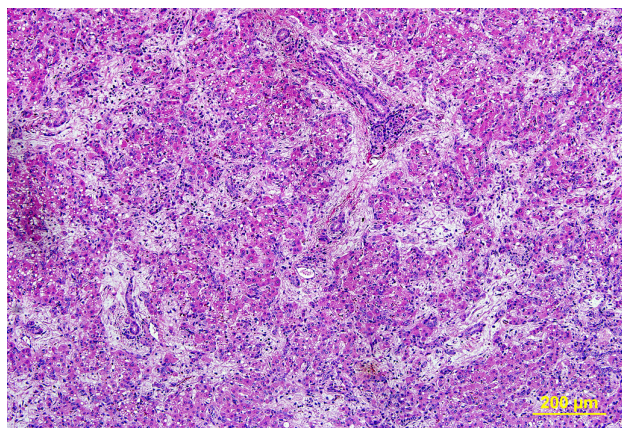


Fig.9. Alterações histológicas no fígado do bezerro que recebeu a dose de 5000 ppb de AFB1. Observam-se áreas focalmente extensivas de fibrose e proliferação de ductos biliares, concentradas principalmente ao redor de espaços porta e, ocasionalmente, conectando um ducto ao outro; os feixes de colágeno estão levemente separados por edema. Numerosos hepatócitos apresentam degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios em meio ao parênquima remanescente. HE, obj.10x.

remanescente. Lesão venooclusiva incipiente (Fig.13), caracterizada por fibrose leve do espaço subendotelial das veias hepáticas terminais, foi um achado pouco frequente nas biópsias hepáticas desse caso e nas dos demais bezerros intoxicados nesse experimento. Não foram observadas alterações nos demais órgãos e tecidos analisados.

DISCUSSÃO

O impacto na capacidade produtiva dos animais e as alterações e patológicas descritos em casos naturais e experimentais de aflatoxicose em bovinos foram reproduzidas em três bezerros nesse estudo, demonstrando a susceptibilidade de bovinos nessa faixa etária a doses iguais ou maiores do que 1.250 ppb de AFB1, quando ingeridas diariamente, por um período de até dois meses, semelhantemente ao que é relatado na literatura (Garret et al. 1968,

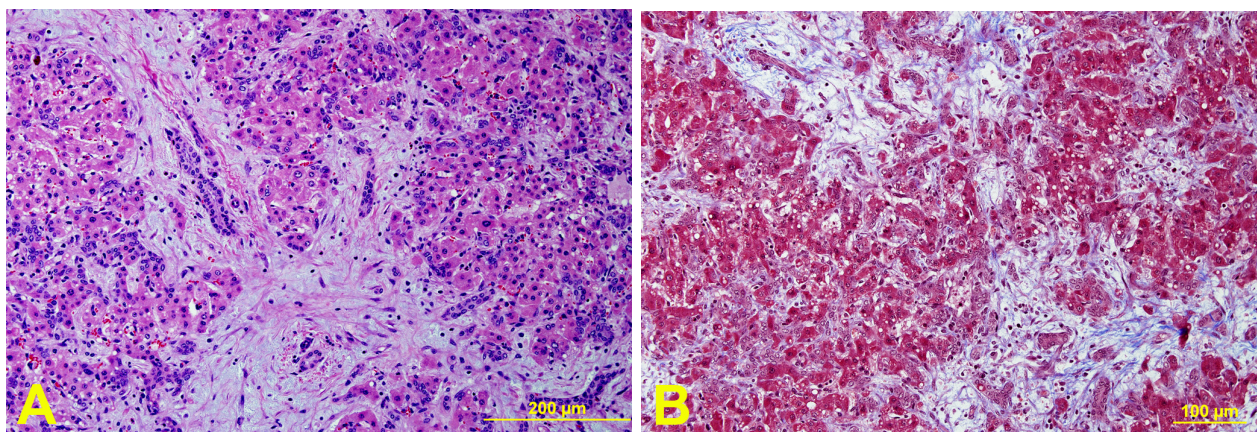


Fig.10. Alterações histológicas no fígado do bezerro que recebeu a dose de 5000 ppb de AFB1. (A) Visão aproximada das lesões descritas na Figura 9. Observam-se as áreas de fibrose e proliferação de ductos biliares, concentradas principalmente ao redor de espaços porta e, ocasionalmente, conectando um ducto ao outro e o material basofílico pálido e homogêneo que separa os feixes de colágeno. HE, obj.20x. (B) Mesma lesão em espécime de fígado corado pelo tricrômico de Masson. Observe a quantidade de feixes de colágenos e a separação entre esses. Obj.20x.

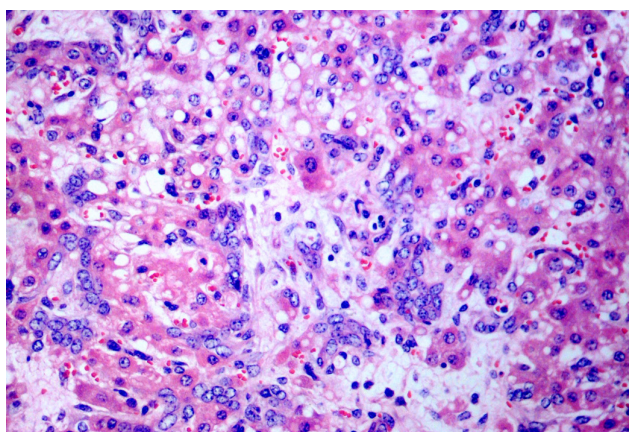


Fig.11. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5.000 ppb de AFB1. Isolados ou múltiplos macro e microvacúolos intracitoplasmáticos (degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios) em hepatócitos remanescentes, cercados por numerosos ductos biliares neoformados e tecido fibroso. HE, obj.40x.

Keyl & Booth 1970, Lynch et al. 1970, 1971, Pier et al. 1976, Pedugsorn et al. 1980, Colvin et al. 1984, Osweiler & Trampel 1985, Hall et al. 1989, Van Halderen et al.1989, Kellerman et al. 2005, D'Angelo et al. 2007, Pierezan et al. 2010). No entanto, bezerros recebendo doses diárias de 500 ± 100 ppb de aflatoxina, durante dois meses, não desenvolveram lesões histológicas e sinais clínicos que pudessem estar associadas a ingestão dessa toxina, demonstrando a maior tolerância dos bovinos a essa doses.

A fim de comparar as doses de AFB1 utilizadas em estudos experimentais prévios ou observadas em surtos espontâneos, geralmente expressas em mg/kg de peso vivo/dia, às doses utilizadas nesses dois experimentos, essas podem ser apresentadas nessa unidade. No primeiro experimento, no qual a dose utilizada foi de 500 ± 100 ppb ($0,5 \pm 0,1$ mg de AFB1/kg de ração), esta unidade é obtida pela multiplicação

da quantidade de aflatoxina em um quilo ração ($0,5 \pm 0,1$ mg) pela média da quantidade de ração ingerida diariamente por cada bezerro. Esse resultado é então dividido pelo peso médio de cada bezerro. Dessa forma, estima-se que os bezerros do grupo tratamento, do primeiro experimento, tenham ingerido aproximadamente 0,0075 mg de AFB1/kg p.v./dia. Seguindo o mesmo cálculo, os bezerros do segundo experimento, que recebiam diariamente 1,25, 2,5 e 5,0 mg de AFB1/kg de ração, ingeriram aproximadamente 0,02, 0,04 e 0,08 mg de AFB1/kg p.v./dia, respectivamente.

Se a dose de AFB1 utilizada no primeiro experimento for comparada com doses de AFB1 utilizadas em estudos experimentais prévios será concluído que ela é insuficiente para causar intoxicação em bezerros, pois a menor dose tóxica de aflatoxina, descrita nesses estudos como causa de lesões hepáticas em bovinos, foi de 700 ppb. Nesse mesmo artigo, as duas menores doses testadas (100 ppb e 300 ppb) estavam muito distantes deste valor, deixando dúvidas sobre o possível efeito de doses de 400, 500 e 600 ppb (Keyl

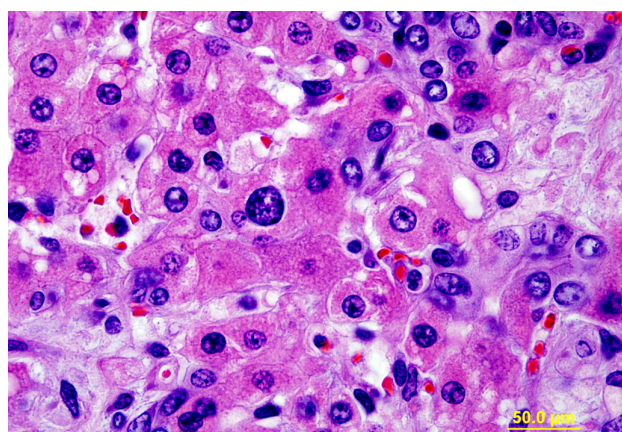


Fig.12. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5000 ppb de aflatoxina B1. Observe no centro da figura um hepatócito com núcleo aumentado duas a três vezes de tamanho (megacitose). HE, obj.100x.

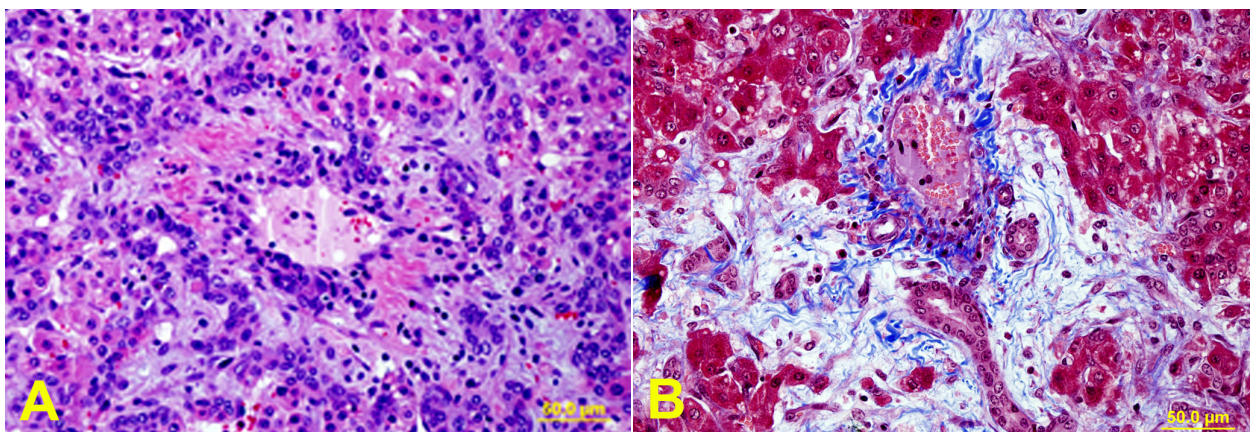


Fig.13. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Que recebeu a dose de 5000 ppb de AFB1. (A) Lesão venooclusiva incipiente; o espaço subendotelial das veias centrolobulares está levemente distendido tecido fibroso. HE, obj.40x. (B) Mesma lesão em corte de fígado corado pelo tricrômico de Masson, obj.40x.

& Booth 1970). Outro estudo, incluindo a dose de 0,008mg de AFB1/kg p.v./dia, não pode demonstrar os efeitos da mesma em bezerros, pois os dois animais testados morreram nas primeiras semanas de experimento de causas não relacionadas à ingestão da toxina (Lynch et al. 1970). No entanto, em surtos espontâneos de aflatoxicose em bovinos, doses de 50 a 200 ppb, têm sido relacionadas à doença hepática crônica (Dutra et al. 2011) ou aguda (McKenzie et al. 1981), respectivamente. Os resultados obtidos em nosso primeiro experimento, não puderam confirmar esses dados e indicam que doses de 50 a 200 ppb, assim como as demais doses abaixo de 500 ± 100 ppb de AFB1, não são suficientes para produzir a lesão hepática, aguda ou crônica, sequer em bezerros. Por outro lado, doses semelhantes às utilizadas no segundo experimento são comprovadamente tóxicas para bovinos jovens e causam sinais clínicos e lesões semelhantes às descritas nesse experimento, tanto em condições experimentais (Garret et al. 1968, Keyl & Booth 1970, Lynch et al. 1970), como naturais (Pedugsorn et al. 1980, Colvin et al. 1984, Osweiler & Trampel 1985, Hall et al. 1989, D'Angelo et al. 2007). No entanto, uma dose maior (0,1 mg/kg p.v./dia) do todas as doses aqui testadas já foi descrita como não tóxica para bovinos (Pier et al. 1976). A maior dose testada nos experimentos descritos aqui (5.000 ppb) foi idêntica a dose estimada em um surto espontâneo observado nesse laboratório e previamente descrito pelos autores (Pierezan et al. 2010). Através dos resultados aqui obtidos, comprovou-se não apenas o envolvimento dessas toxinas com esse surto, devido à semelhança dos achados clínicos e patológicos em ambos os casos, mas também o alto efeito tóxico dessa dose para bovinos nessa faixa etária.

Não foram observados sinais clínicos que pudessem estar associados à ingestão de aflatoxinas nos bezerros do primeiro experimento, durante todo período experimental e três semanas após o término desse período. Os bezerros deste experimento, que receberam 0,0075mg de AFB1/kg p.v./dia, apresentaram apetite normal durante todo período experimental e ingeriram quantidades crescentes de ração, considerando-se que esse volume foi ajustado semanalmente conforme o peso dos animais, diferentemente de

outro estudo experimental, no qual doses equivalentes a 0,008mg de AFB1/kg p.v./dia, misturadas a ração, induziram perda de apetite dos animais já nas primeiras semanas de experimento (Lynch et al. 1970).

Os sinais clínicos observados nos bezerros do segundo experimento, caracterizados por perda de apetite, diminuição do ganho de peso e emagrecimento, mesmo que inespecíficos, são descritos na grande maioria dos casos naturais e experimentais de aflatoxicose em bezerros (Garret et al. 1968, Keyl & Booth 1970, Lynch et al. 1970, 1971, Pier et al. 1976, Pedugsorn et al. 1980, Colvin et al. 1984, Osweiler & Trampel 1985, Van Halderen et al. 1989, D'Angelo et al. 2007, Pierezan et al. 2010, Dutra et al. 2011). Nesse experimento, o início e a evolução dos sinais clínicos variaram conforme a quantidade de toxina administrada. Perda de apetite, o sinal clínico mais precoce nesse experimento, foi observado no 10º dia de experimento no bezerro recebendo a maior dose, enquanto que, para menor dose tóxica testada, esse sinal foi observado 42 dias após o início da ingestão da toxina. Como discutido anteriormente, esse sinal já foi descrito em bezerros nas duas primeiras semanas de ingestão da toxina misturada à ração, mesmo quando testadas doses menores (Lynch et al. 1970), porém, em um estudo onde toxina foi administrada separadamente, o início desse sinal clínico foi semelhante ao observado nesse experimento, principalmente nas doses de 0,08 e 0,1mg/kg p.v./dia (Lynch et al. 1971). Diminuição do ganho de peso e emagrecimento, comumente descritos em casos de aflatoxicose em bezerros, podem estar associados tanto com a ação direta das aflatoxinas aos hepatócitos, causando inibição da produção de proteínas pelo fígado, bem como pela diminuição do consumo de alimento, devido à perda de apetite (Lynch et al. 1970).

Sinais clínicos considerados terminais em casos de aflatoxicose, como icterícia e diarreia intermitente (Colvin et al. 1984, Van Halderen et al. 1989, Kellerman et al. 2005) foram observados apenas no bezerro recebendo a dose de 5.000 ppb e estavam associados diretamente à lesão hepática crônica. Não foram observados sinais neurológicos dos bezerros desse experimento, apesar desses sinais já

terem sido descritos em casos de aflatoxicose em bezerros, associados à encefalopatia hepática (D'Angelo et al. 2007). Hemorragias associadas a distúrbios da hemostasia, comumente observada em casos de aflatoxicose em cães (Newman et al. 2007), não foram observadas nos bezerros desse experimento.

Alterações bioquímicas nos casos de aflatoxicose são representadas principalmente pelo aumento da atividade sérica das enzimas FA e GGT (Garret et al. 1968, Keyl & Booth 1970, Lynch et al. 1970), como observado principalmente nos bezerros do segundo experimento. A alteração nos níveis de FA e GGT demonstra lesão hepática primária caracterizada por proliferação de ductos biliares e lesão direta aos hepatócitos, respectivamente, o que pode ser comprovado nesse experimento pois o aumento da atividade sérica dessas enzimas seguiu o aparecimento dessas lesões nas biópsias hepáticas. No primeiro experimento, o nível sérico dessas enzimas foi semelhante nos bezerros do grupo controle e tratamento durante a maior parte do período experimental até a última coleta do experimento. O nível da FA, em ambos os grupos, esteve acima dos valores normais de referência a partir da coleta do 35º de experimento, enquanto que o nível da GGT, também nesses dois grupos, esteve acima dos valores normais de referência a partir da coleta do 49º dia de experimento. No entanto, durante todo período experimental, não foram observadas lesões histológicas associadas à ingestão da toxina, que justificassem o aumento da atividade sérica dessas enzimas. Dessa forma, a variação dos níveis dessas enzimas não pode ser esclarecida nesse experimento.

A diminuição acentuada nos níveis de albumina sérica, observada na coleta do 49º dia de experimento, no bezerro recebendo 5.000 ppb poderia estar relacionada tanto com a ocorrência de diarreia nesse animal dias antes dessa coleta, como com a diminuição da síntese dessa proteína, devido à lesão hepática crônica. O hematócrito e os níveis da enzima sérica AST, bem como de BT, BD e PT permaneceram inalterados durante todo período experimental nos bezerros intoxicados no segundo experimento. Embora alguns estudos demonstrem um aumento nos níveis da AST em casos de aflatoxicose (Pier et al. 1976, D'Angelo et al. 2007), outros estudos demonstram que os níveis dessa enzima (Garret et al. 1968, Keyl & Booth 1970), bem como das proteínas totais e da albumina permanecem inalterados nos casos dessa doença em bovinos (Lynch et al. 1970, Van Halderen et al. 1989). Dessa forma, esses parâmetros aparentam não ser confiáveis para o diagnóstico clínico dessa doença.

O fígado é o órgão alvo nos casos de intoxicação por aflatoxinas em animais (Kellerman et al. 2005). Lesões macroscópicas nesses casos, são caracterizadas por alteração da cor e tamanho do órgão, devido à substituição do parênquima hepático principalmente por ductos biliares proliferados e degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios, que, em associação com edema, geralmente provocam leve aumento de volume do órgão (Garret et al. 1968, Keyl & Booth 1970, Pedugsorn et al. 1980, Osweiler & Trampel 1985, D'Angelo et al. 2007), como observado na necropsia do animal re-

cebendo 5.000 ppb. As demais alterações macroscópicas observadas nesse caso foram secundárias a lesão hepática crônica. Dessa forma, edema observado na submucosa e serosa do trato gastrointestinal ou na forma de ascite, esteve relacionado tanto com hipoproteïnemia (hipoalbuminemia), como elevação da hipertensão portal devido à fibrose incipiente ao redor de veias hepáticas terminais.

A biópsia hepática demonstrou que pode ser um método auxiliar no diagnóstico da doença pré-clínica, pois lesões iniciais, caracterizadas por degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios e proliferação de ductos biliares, puderam ser percebidas nas biópsias antes do aparecimento dos sinais clínicos. Essas duas lesões, em conjunto com fibrose, aparentam ser os principais achados histológicos em casos de aflatoxicose em bovinos. No entanto, na maioria dos casos de aflatoxicose, fibrose ocorre em grau leve a moderado, variando conforme a cronicidade das lesões, e megalocitose é um achado infrequente (Hill 1963, Lynch et al. 1970, 1971, Pier et al. 1976, Colvin et al. 1984, Osweiler & Trampel 1985).

Esses achados histológicos podem contribuir para o diagnóstico diferencial entre aflatoxicose e intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos, associados principalmente à ingestão de plantas do gênero *Senecio*. Embora as lesões nessas duas doenças sejam muito semelhantes, a lesão hepática em bovinos intoxicados por alcaloides pirrolizidínicos é caracterizada principalmente pela presença de fibrose, megalocitose e proliferação de ductos biliares biliar, mesmo que, nessa doença diferentes padrões, com variações na distribuição e quantidade dessas lesões, possam ser observados (Grecco et al. 2010). Aparentemente, nos casos de aflatoxicose, a distribuição e quantidade de ductos biliares proliferados e degeneração vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios é maior do que nos casos de intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos (Dutra et al. 2011), ao contrário da quantidade de fibrose e megalocitose, que aparentam ser menores na maioria dos casos de aflatoxicose. Lesão venooclusiva, comumente descritas em casos de aflatoxicose (Lynch et al. 1970, 1971, Colvin et al. 1984, Hall et al. 1989, Pierezan et al. 2010), e seneciase (Stalker & Hayes 2007) foi discreta nos bezerros desse experimento, provavelmente devido ao curto tempo de ingestão da toxina.

Concluindo, esse estudo demonstra que doses diárias de 1.250 ppb, 2.500 ppb e 5.000 ppb de aflatoxina B1, em condições experimentais, são tóxicas para bovinos jovens, produzindo sinais clínicos antes do fim do primeiro mês, quando utilizadas as doses mais altas, e lesão hepática crônica, em menos de dois meses de ingestão da toxina, quando utilizadas as três doses testadas. Porém, bezerros ingerindo doses menores ou iguais a 500±100 ppb de AFB1 não desenvolvem achados patológicos característicos da doença, mesmo após um período de dois meses de ingestão da toxina, mas podem apresentar mínimas alterações bioquímicas a partir da metade do segundo mês.

Agradecimentos. - A doutora Raquel Rubia Rech pelo auxílio na confecção das fotografias das lesões histológicas

REFERÊNCIAS

- Allcroft R. & Lewis G. 1963. Groundnut toxicity in cattle: Experimental poisoning of calves and report on clinical effects in older cattle. *Vet. Rec.* 75:487-493.
- Barros C.S.L., Castilhos L.M., Rissi D.R., Kommers G.D. & Rech R.R. 2007. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 7:53-60.
- Colvin B.M., Harrison L.R., Gosser H.S. & Hall R.F. 1984. Aflatoxicosis in feeder cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184:956-958.
- D'Angelo A., Bellino C., Alborali G.L., Biancardi A., Borrelli A., Capucchio M.T., Catalano D., Dellaferrera G., Maurella C. & Cagnasso A. 2007. Neurological signs associated with aflatoxicosis in Piedmontese calves. *Vet. Rec.* 160:698-700.
- Dutra F. 2011. Enfermedades diagnosticadas. *Archivo Veterinario Del Este* 3:4-12.
- Garret W.N., Heitman H. & Booth A.N. 1968. Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127:188-190.
- Grecco F.B., Schild A.L., Soares M.P., Marcolongo-Pereira C., Estima-Silva P. & Sallis E.S.V. 2010. Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):389-397.
- Hall R.F., Harrison L.R. & Colvin B.M. 1989. Aflatoxicosis in cattle pastured in a field of sweet corn. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194:938.
- Hill K.R. 1963. Comment on the histological appearances in serial liver biopsies and post-mortem specimens. *Vet. Rec.* 75:493-494.
- Hussein H.S. & Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.
- Kellerman T.S., Coetzer J.A.W., Naudé T.W. & Botha C.J. 2005. *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, p.3-6.
- Keil A.C. & Booth A.N. 1971. Aflatoxin Effects in Livestock. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48:559-604.
- Lafuf O., Termezana A., Rivero R., Riet Alvariza F., Feed O., Féola R., Diaz L., Gimenez G., Varela A., Camino A. & Uriarte G. 1989. Um caso de aflatoxicose em bovinos associado a maiz carbonoso. 17^{as} Jornadas Uruguayas de Buiatria, Pasandú, Uruguai, Seção cc 8, p.1-8.
- Lynch G.P., Todd G.C., Shalkop W.T. & Moore L.A. 1970. Responses of dairy calves to aflatoxina-contaminated feed. *J. Dairy Sci.* 53:63-71.
- Lynch G.P., Shalkop W.T., Jakoby N.M., Smith D.F. & Miller R.W. 1971. Responses of dairy calves to oral doses of aflatoxin. *J. Dairy Sci.* 54:1688-1698.
- McKenzie R.A., Blaney B.J., Connole M.D. & Fitzpractick A. 1981. Acute aflatoxicosis in cattle fed peanut hay. *Aust. Vet. J.* 57:284-286.
- Newman S.J., Smith J.R., Stenske K.A., Newman L.B., Dunlap J.R., Imerman P.M. & Kirk C.A. 2007. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *J. Vet. Diag. Invest.* 19(2):168-175.
- Oswieiller G.D. & Trampel D.W. 1985. Aflatoxicosis in feedlot calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 6:636-637.
- Patterson D.S.P. & Anderson P.H. 1982. Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet. Rec.* 110: 60.
- Pedugsorn C., Promma S., Ratanacchot P. & Rietschel W. 1980. Chronic aflatoxicosis in cattle on an animal breeding station in North Thailand. *Anim. Res. Development* 11:106-111.
- Pier A.C., Cysewski S.J., Richard J.L., Baetz A.L. & Mitchell L. 1976. Experimental mycotoxicosis in calves with aflatoxin, ochratoxin, rubratoxin and T-2 toxin. *Proc. 80th Ann. Meeting U.S. Anim. Health Assoc.*, p.130-148.
- Pierezan F., Oliveira Filho J.C., Carmo P.M., Lucena R.B., Rissi D.R., Togni M. & Barros C.S.L. 2010. Surto de aflatoxicose em bezerras no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):418-422.
- Richard J.L., Pier A.A., Stubblefield R.D., Shotwell O.L., Lyon R.L. & Cutlip R.C. 1983. Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissues residues in steers. *Am. J. Vet. Res.* 44:1294-1299.
- Sastry G.A., Narayana J.V., Rama Rao P., Cristopher J. & Hill K. 1965. A report on the groundnut toxicity in Murrah buffaloes in Andra Pradesh (India). *Indian Vet. J.* 42:79.
- Silva F.A.S. & Azevedo C.A.V. 2002. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revta Bras. Prod. Agroindustr.* 4(1):71-78.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system, p.297-388. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Shotwel O.L., Hesseltine C.W., Stubblefield R.D. & Sorenson W.G. 1966. Production of aflatoxin on rice. *American Society for Microbiology, Michigan*, 14(3):428-429.
- Stöber M. 1990. Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame clínico geral, p.44-80. In: Dirksen G., Gründer H.-D. & Stöber M. (Eds), *Rosenberger Exame Clínico dos Bovinos*. 3^a ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.
- Vaid J., Dawra R.K., Sharma O.P. & Negi S.S. 1981. Chronic aflatoxicosis in cattle. *Vet. Human Toxicol.* 23:436-438.
- Van Halderen A., Green J.R., Marasas W.F.O., Thiel P.G. & Stockenstrom S. 1989. A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the Western Cape Province. *J. South Afr. Vet. Assoc.* 60:210-211.
- Yiannikouris A. & Jouany J. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Anim. Res.* 51:81-99.

5 DISCUSSÃO

Com base nos achados epidemiológicos e clínico-patológicos observados no surto natural e nos dois experimentos realizados nesse estudo, em concordância com os dados de outros surtos naturais e experimentos sobre aflatoxicose em bovinos descritos na literatura, pode-se afirmar que a doença é rara nessa espécie, tem curso geralmente crônico, afeta exclusivamente o fígado e seu diagnóstico é complexo, pois depende da associação desses achados com a presença de altos níveis de aflatoxina no alimento. A escassez de casos dessa doença em bovinos pode ser explicada pela tolerância desses animais a doses elevadas de toxinas (até 700 ppb), pela necessidade de um longo tempo de ingestão do alimento contaminado, pela presença de baixos níveis de toxinas nos alimentos em relação à dose tóxica mínima para a espécie e pela ocorrência quase exclusiva da doença em animais jovens (GOPAL et al., 1968; GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976; PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; PATTERSON; ANDERSON, 1982; COLVIN et al. 1984; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al., 2007, DUTRA et al., 2011).

Níveis de 500 ± 100 ppb de aflatoxina, mesmo que ingeridos por períodos de até três meses, são insuficientes para causar a intoxicação em bezerros, como observado no primeiro experimento desse estudo, no qual não foram observados sinais clínicos significativos ou lesões hepáticas nos animais do grupo recebendo a ração contaminada. Considerando-se os resultados desse experimento e os observados em outros estudos experimentais (GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; HELFERICH et al., 1986), estima-se que a dose tóxica mínima para a produção de sinais clínicos e lesões hepáticas em bovinos seja de 700 ppb de aflatoxinas. Essa dose quando transformada para a unidade de mg/kg p.v./dia, para um animal de 100 kg, recebendo diariamente 2,0 kg de ração, corresponde a 0,014mg de aflatoxinas/kg p.v./dia, o que está próximo da dose tóxica mínima de 0,02mg de aflatoxinas/kg p.v./dia (LYNCH et al., 1970; PIER et al., 1976). O nível de 5.136ppb de aflatoxinas encontrado no milho consumido pelos bezerros intoxicados naturalmente estava entre os valores observados em outros surtos espontâneos de aflatoxicose em bezerros descritos na literatura, os quais eram, geralmente, maiores do que 1.000 ppb (GOPAL et al., 1968; PEDUGSORN et al.,

1980; COLVIN et al. 1984; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al., 2007). Esse nível estava inclusive muito acima de valores considerados tóxicos por alguns estudos experimentais da doença na espécie (GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971). No segundo experimento demonstrou-se que doses diárias de 1.250, 2.500 e 5.000 ppb de AFB1, são tóxicas para bovinos jovens, produzindo sinais clínicos antes do fim do primeiro mês, quando utilizadas as doses mais altas, e lesão hepática crônica, em menos de dois meses de ingestão da toxina, quando utilizadas as três doses testadas. Esses dados estão em conformidade com os de outros estudos experimentais que utilizaram doses semelhantes para a reprodução da doença nessa espécie (GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976).

Quando comparado os nível de aflatoxinas necessário para causar a doença em bovinos com o nível médio de aflatoxinas encontrado em alimentos no Brasil como, por exemplo, em amostras de milho (49% de contaminação, 11,2 ppb de aflatoxinas em média) ou silagem (20% de contaminação, 2,1 ppb de aflatoxinas em média) (MALLMANN et al., 2009), observa-se que esses produtos apresentam níveis extremamente inferiores ao mínimo (700 ppb) estimado para o desenvolvimento da doença nessa espécie (GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; HELFERICH et al., 1986). Esse pode ser um dos motivos da escassez de casos naturais de aflatoxicose em bovinos no país. Mesmo assim, a análise de alimentos visivelmente contaminados ou de má qualidade é sempre indicada e, caso níveis elevados de toxina sejam detectados, o fornecimento desse produto por longos períodos para animais jovens ou para animais em lactação não é recomendado.

Ruminantes estão entre animais mais resistentes a essa intoxicação, pois as aflatoxinas são parcialmente degradadas pela microbiota ruminal (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Esse fato pode explicar a maior resistência de animais adultos à intoxicação, uma vez que bovinos até o desmame são semelhantes a monogástricos, pois grande parte da digestão do alimento nessa fase ocorre no abomaso e seus rumens são pouco desenvolvidos. O desenvolvimento completo desse órgão e de sua flora microbiana ocorre somente alguns meses após o desmame. Portanto, a absorção de aflatoxinas é maior nos animais jovens, enquanto que doses extremamente elevadas sejam necessárias para intoxicar bovinos adultos. Na ampla maioria dos surtos espontâneos de aflatoxicose em bovinos, assim como nos casos naturais e experimentais deste estudo, os animais afetados tinham de três meses a um ano de idade (AUST, 1964; GOPAL et al., 1968; PEDUGUSORN et al., 1980; MCKENZIE et al., 1981; VAN HELDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al. 2007).

A doença teve evolução crônica nos bezerros do surto espontâneo e nos bezerros do segundo experimento e os sinais clínicos nesses casos foram caracterizados principalmente por perda de apetite, diminuição do ganho de peso, emagrecimento e alteração dos níveis séricos das enzimas FA e GGT. Os principais achados histopatológicos estavam restritos ao fígado e consistiam de fibrose, hiperplasia de ductos biliares, lesão veno-oclusiva e leve megalocitose. Tanto os achados clínicos como patológicos nesses casos são semelhantes aos observados na maioria dos casos naturais e experimentais de aflatoxicose em bovinos descritos na literatura (GOPAL et al., 1968; GARRET et al., 1968; KEYL; BOOTH, 1970; LYNCH et al., 1970; LYNCH et al., 1971; PIER et al., 1976; PEDUGSORN et al., 1980; VAID et al., 1981; PATTERSON; ANDERSON, 1982; COLVIN et al. 1984; OSWEILLER; TRAMPEL, 1985; HALL et al., 1989; VAN HALDEREN et al., 1989; D'ANGELO et al., 2007, DUTRA et al., 2011).

O diagnóstico definitivo da aflatoxicose em bovinos depende da associação de fatores epidemiológicos, clínicos e patológicos observados nos casos ou surtos, com a análise micológica do alimento e análise química de alimentos ou tecidos (KELLERMAN et al., 2005). Alguns cuidados devem ser tomados especialmente em relação à amostragem do alimento, pois problemas com esse procedimento implicam na detecção de níveis extremamente altos ou baixos de aflatoxinas, como assumido no relato do surto natural da doença, ou que podem ter ocorrido em alguns dos surtos naturais descritos na literatura, nos quais são descritos níveis tóxicos de 20 ppb a 77.000 ppb de aflatoxinas, ou variações de 96-1.700 ppb ou 1.100-25.000 ppb foram encontrados em amostras de um mesmo surto (GOPAL et al., 1968, OSWEILLER; TRAMPEL, 1985, RAY et al., 1986; DUTRA, 2011).

A biópsia hepática demonstrou que pode ser um método auxiliar no diagnóstico da doença pré-clínica, pois lesões iniciais, caracterizadas por degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios e proliferação de ductos biliares, puderam ser percebidas nas biópsias antes do aparecimento dos sinais clínicos. A evolução das lesões hepáticas conforme o tempo de ingestão e a quantidade de toxinas ingeridas foi demonstrada pela primeira através do segundo experimento, pois no único estudo experimental em que a evolução dessas lesões havia sido demonstrada, a quantidade de aflatoxinas no farelo de amendoim fornecido aos bovinos não era conhecida (ALLCROFT; LEWIS, 1963; HILL, 1963).

6 CONCLUSÕES

- A intoxicação, mesmo que raramente, ocorre em nosso país, como demonstrado pelo surto espontâneo descrito nesse estudo. Sua evolução é crônica e animais jovens são mais afetados.
- Bezerros ingerindo doses menores ou iguais a 500 ± 100 ppb de AFB1 não desenvolvem achados patológicos característicos da doença, mesmo após um período de dois meses de ingestão da toxina, mas podem apresentar mínimas alterações bioquímicas a partir da metade do segundo mês.
- Doses diárias de 1250ppb, 2500ppb e 5000ppb de AFB1, em condições experimentais, são tóxicas para bovinos jovens, produzindo sinais clínicos antes do fim do primeiro mês, quando utilizadas as doses mais altas, e lesão hepática crônica, em menos de dois meses de ingestão da toxina, quando utilizadas as três doses testadas.
- Alterações bioquímicas nos casos de aflatoxicose são representadas principalmente pelo aumento da atividade sérica das enzimas FA e GGT.
- Tanto nos casos naturais como experimentais o fígado é o órgão alvo nos casos de intoxicação por aflatoxinas em bovinos e os principais achados histopatológicos estão restritos a esse órgão e consistem de fibrose, hiperplasia de ductos biliares, degeneração gordurosa, lesão veno-oclusiva e megalocitose leve.
- A biópsia hepática demonstrou que pode ser um método auxiliar no diagnóstico da doença pré-clínica, pois lesões iniciais, caracterizadas por degeneração citoplasmática vacuolar consistente com acumulação hepatocelular de lipídios e proliferação de ductos biliares, puderam ser percebidas nas biópsias antes do aparecimento dos sinais clínicos.

7 REFERÊNCIAS

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. Groundnut toxicity. An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. **Veterinary Record**, London, v. 75, p. 259-263, Apr 1963.

ALLCROFT, R.; LEWIS, G. Groundnut toxicity in cattle: Experimental poisoning of calves and report on clinical effects in older cattle. **Veterinary Record**, London, v. 75, p. 487-493, May 1963.

AMARAL, K. A. S.; MACHINSKI JR, M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 5, n. 24, p. 56-58, fev./mar. 2006.

ASAO, T. et al. Aflatoxins B and G. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 85, p. 1706-1707, Jun 1963.

AUST, S. D. Effects of feeding moldy corn to cattle. **The Illinois Veterinarian**, Champaign, IL, v. 7, p. 10-12, 1964.

BASAPPA, S. C. et al. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus* Link. **Journal General Microbiology**, Reading, v. 61, p. 81-86, Apr 1970.

BENNET, J. W.; PAPA, K. E. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. In: SIDHU, G. S. (Org.). **Advances in Plant Pathology**. London: Academic Press, 1988. vol. 6, p. 263-280.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal Food Protection**, Des Moines, IA, v. 50, p. 1058-1073, Dec 1987.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, London, v. 9, p. 52-77, Mar 1961.

BURNSIDE, J. E. et al. A disease of swine and cattle caused by eating mold corn. II. Experimental production with pure cultures of molds. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 18, p. 817-824, Oct 1957.

CALDAS, E. D. et al. Aflatoxinas e Ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 319-323, Jun 2002.

- CACCIAMANI, J. L. M. et al. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e Ocrotoxina a presentes em farelo e farinhas cereais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 157-164, jan./jun. 2007.
- CLEGG, F. G.; BRYSON, H. An outbreak of poisoning in store cattle attributed to Brazilian groundnut meal. **Veterinary Record**, London, v. 74, p. 992-994, Sep 1962.
- COLVIN, B. M. et al. Aflatoxicosis in feeder cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 184, p. 956-958, Apr 1984.
- D'ANGELO, A. et al. Neurological signs associated with aflatoxicosis in Piedmontese calves. **Veterinary Record**, London, v. 160, p. 698-700, May 2007.
- DE IONGH, H. et al. Milk of mammals fed on aflatoxins containing diet. **Nature**, London, v. 202, p. 466-476, May 1964.
- DIENER, U. L.; DAVIS, N. D. Production of aflatoxin on peanuts under controlled environments. **Journal of the Stored Products Research**, Oxford, v. 5, p. 251-258, Nov 1969.
- DUTRA, F. Enfermedades diagnosticadas. **Archivo Veterinario Del Este**. Treinta y Tres, v. 3, n. 10, p. 4-12, jul./set. 2011.
- ENGEL, G. Production of mycotoxins and their quantitative determination 4. Extent of aflatoxin synthesis by *Aspergillus flavus* in dependence on the quality and quantity of carbohydrates available. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 30, p. 588-591, 1975.
- EPSTEIN, E. et al. Aflatoxin production as affected by environmental conditions. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 35, n. 4, p. 389-391, Jul 1970.
- FORGACS, J. et al. Additional studies on the relationship of mycotoxicoses to the poultry hemorrhagic syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 19, p. 744-753, Jul 1958
- FORRESTER, L. M. et al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Hanover, PA, v. 87, p. 8306-8310, Nov 1990.

- GARRET, W. N., HEITMAN, H.; BOOTH, A. N. Aflatoxin toxicity in beef cattle. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Maywood, NJ, v. 127:188-190, Jan 1968.
- GOPAL, T. et al. Aflatoxicosis in dairy cattle. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 45, n. 9, p. 707-712, Sep 1968.
- HALL, R. F. et al. Aflatoxicosis in cattle pastured in a field of sweet corn. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 194, p. 938, Apr 1989.
- HAYES, J. D. et al. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. **Pharmacology & Therapeutics**, Kansas City, v. 50, p. 443-72, Nov./Dec. 1991.
- HEATHCOTE, J. G.; HIBBERT, J. R. **Aflatoxins: chemical and biological aspect**. New York: Elsevier, 1978. 212 p.
- HELFERICH, W. G. et al. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 62, p. 691-696, Mar 1986.
- HILL, K. R. Comment on the histological appearances in serial liver biopsies and post-mortem specimens. **Veterinary Record**, London, v. 75, p. 493-494, May 1963.
- HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, v. 283, n. 4, p. 525-532, 1991.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Duluth, MN, v. 167, p. 101-134, Oct 2001.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. In: IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon: IARC, 1997. vol. 82, p. 172-195.
- JARVIS, B. Factors affecting the production of mycotoxins. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 199-233, Mar 1971.

JACKSON, H.; WOLF, H.; SINNHUBER, R. O. The relationship of hepatoma in Rainbow trout to aflatoxina contamination and cottonseed meal. **Cancer Research**, Philadelphia, PA, v. 28, p. 987-991, May 1968.

KELLERMAN, T. S. et al. **Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2005. 256 p.

KEIL, A. C.; BOOTH, A. N. Aflatoxin Effects in Livestock. **Journal of the American Oil Chemist's**, New York, v. 48, p. 559-604, 1971.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, Ibaraki, v. 48, p. 71-80, Apr 2007.

KULIK, Y. I. A study of the properties of mouldy peas infected by *Aspergillus flavus* Link. **Journal of Microbiology**, Kiev, v. 19, n. 3, p. 36-43, 1957.

LAFLUF, O. et al. Um caso de aflatoxicose em bovinos associado a maiz carbonoso. In: JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA, 17., 1989, Paysandú. **Anais...** Paysandú: Centro Médico Veterinário de Paysandú, Uruguai, 1989. p.1-8.

LANDERS, K. E., DAVIS, N.D.; DIENER, U. L. Influence of atmospheric gases on aflatoxina production by *Aspergillus flavus* in peanuts. **Phytopathology**, St. Paul, MN, v. 57, n. 10, p.1086-1090, Oct 1967.

LOOSMORE, R. M.; MARKSON, L. M. Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. **Veterinary Record**, London, v. 73, p. 813-814, Aug 1961.

LYNCH, G. P. et al. Responses of dairy calves to aflatoxina-contaminated feed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 53, p. 63-71, Jan 1970.

LYNCH, G. P. et al. Responses of dairy calves to oral doses of aflatoxin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 54, p. 1688-1698, Nov 1971.

MALLMANN, C. A. et al. Micotoxinas: impactos e estratégias de controle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1. 2009, São Pedro, SP. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p. 269-280.

MALLMANN, C. A. et al. Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas. In: LAMIC. Santa Maria: Lamic, 2013. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/artigos.html>. Acesso em: 10 jan. 2013.

MCKENZIE, et al. Acute aflatoxicosis in cattle fed peanut hay. **Australian Veterinary Journal**, St. Leonards, v. 57, p. 284-286, Jun 1981.

MELO, M. M. et al. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B1 presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 6, p. 555-558, Dec 1999.

MÜRMAN, L. et al. Avaliação dos índices de aflatoxinas em soja. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 5., 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas, 2003.

NESBITT, B. F. et al. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature**, London, v. 195, p. 1062-1063, Sep 1962.

NEWBERNE, J. W. et al. Notes on a Recent Outbreak and Experimental Reproduction of "Hepatitis X" in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 127, p. 59-62, Jul 1955.

NORTHOLT, M. D. et al. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B1 production in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, v. 40, p. 778, Nov 1977.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e Elisa na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 396-374, set./dez. 2000.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. **Criterios de Salud Ambiental, 11: Micotoxinas**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1983. p. 131.

OSWEILLER, G. D.; TRAMPEL, D. W. Aflatoxicosis in feedlot calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, IL, v. 6, p. 636-637, Sep 1989.

PAGET, G. E. Exsudative hepatitis in Guinea Pigs. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 47, p. 393, Apr 1954.

PATERSON, J. S. Groundnut Toxicity as the cause of Exudative Hepatitis (Oedema Disease) of Guinea Pigs. **Veterinary Record**, London, v. 74, p. 639-640, 1962.

PATTERSON, D. S. P.; ANDERSON, P. H. Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. **Veterinary Record**, London, v. 110, p. 60, Jan 1982.

PEDUGSORN, et al. Chronic aflatoxicosis in cattle on an animal breeding station in North Thailand. **Animal Research and Development**, Tübingen, v. 11, p. 106-111, 1980.

PIER, A. C. et al. Experimental mycotoxicosis in calves with aflatoxin, ochratoxin, rubratoxin and T-2 toxin. In: ANNUAL MEETING OF THE U.S. ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 80., 1976, Miami Beach, FL, **Proceedings...** Saint Joseph: USAHA, 1976. p. 130-148.

RAY, et al. Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, IL., v. 188, p. 1187-1188, May 1986.

RICHARD, J. L. Discovery of aflatoxins and significant historical features. **Toxin Reviews**, New York, v. 27, p. 171-201, Jan 2008.

RICHARD, J. L. et al. Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissues residues in steers. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, p. 1294-1299, Jul 1983.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Técnicas analíticas para micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4., 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 245-247

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 59, n. 1, p. 57-67, May 1997.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, jan./abr. 2000.

SARGEANT, K. et al. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, London, v. 192, p. 1096-1097, Dec 1961.

SCHOENTAL, R. Aflatoxins. **Annual Reviews of Pharmacology**, Palo Alto, v. 7, p. 343-353, Apr 1967.

SHADANAIIKA. Ms. **Mycotoxigenic fungi in spices; molecular methods of detection and control**. 2005. 206 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)-University of Mysore, Mysore, Índia, 2005.

SIPPEL, W. L. A disease of swine and cattle caused by eating mold corn. In: ANNUAL MEETING AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 19., 1953, Toronto, **Proceedings...** Schaumburg: AVMA, 1953. p. 174-181

STALKER, M. J.; HAYES, M. A. Liver and biliary system. In: Maxie M.G. (Org.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. vol. 2. p.297-388.

STÖBER, M. Aspergillotoxikose. In: ROSEMBERG, G. (Org.). **Krankheiten des Rindes**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1970. p. 1240-1242.

TAYLOR, M. C. et al. Identification and characterization of two families of F42OH2 dependent reductases from Mycobacteria that catalyse aflatoxina degradation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 561-575, Nov 2010.

TERAO, K.; UENO, Y. Morphological and Functional damage to cells and tissues. In: URAGUCHI, K.; YAMAZAKI, M. (Org.). **Toxicology, biochemistry and phatology of mycotoxins**. New York: Wiley, 1978. p. 189-210.

TRIPATHI, S.; MISHRA, H. N. Enzymatic coupled with UV degradation of aflatoxina b1 in red chili poder. **Journal of Food Quality**, Malden, MA, v. 33, p. 186-203, Apr 2010.

VAID, et al. Chronic aflatoxicosis in cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 23, p. 436-438, Dec 1981.

VAN DER ZIDJEN, A. S. M. et al. *Aspergillus flavus* and turkey x disease. Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey x disease. **Nature**, London, v. 195, p. 1060-1062, Sep 1962.

VAN HELDEREN, A. et al. A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the western Cape Province. **Journal of South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 60, p. 210-211, 1989.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. Micotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, New York, v. 51, p. 81-99, 2002.

WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap. 24, p. 553-605.

ZORLUGENÇ, B. et al., The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxina B(1) in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3593-3597, Dec 2008.