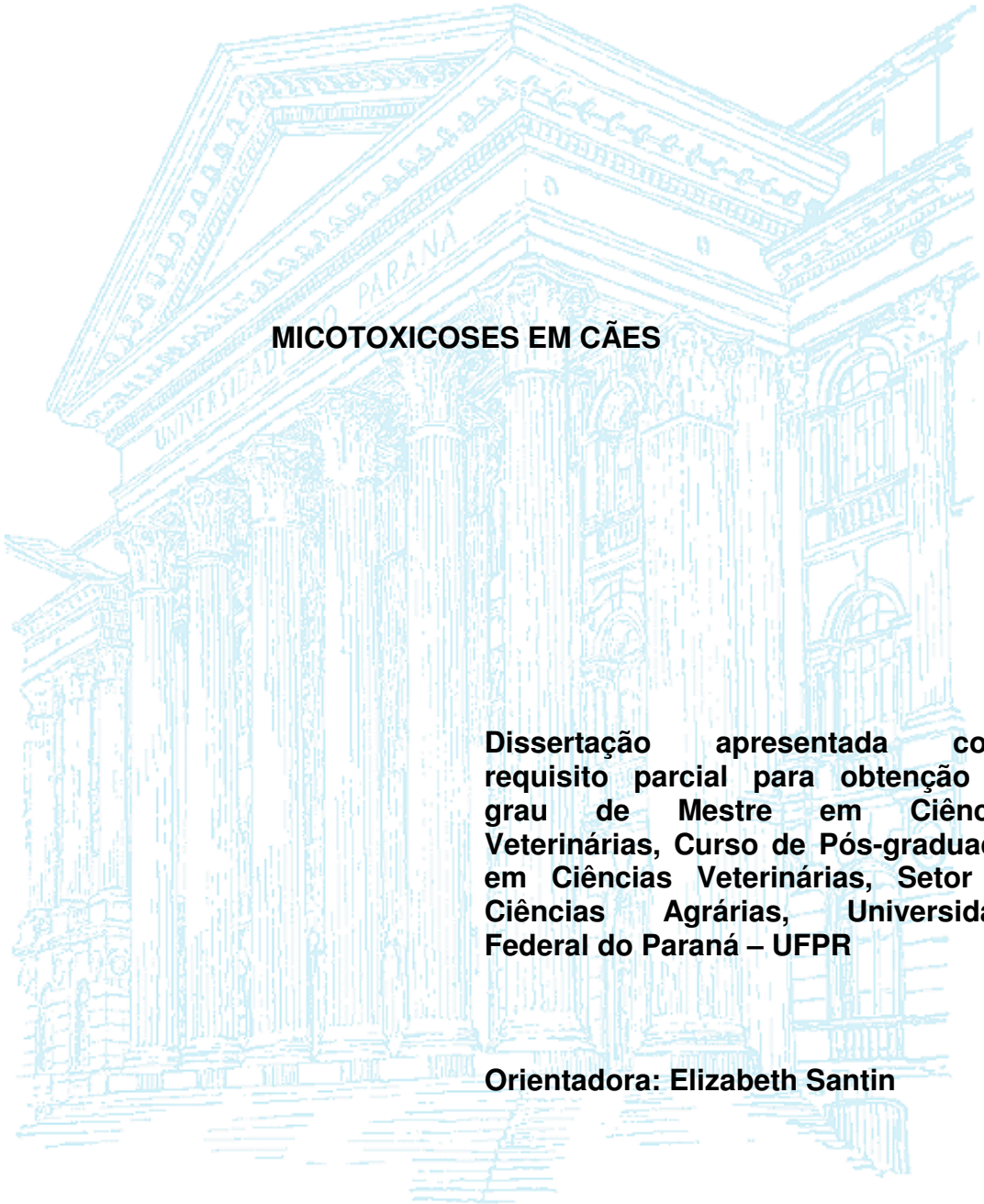
PATRICIA MUZOLON



MICOTOXICOSES EM CÃES

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR

Orientadora: Elizabeth Santin

Curitiba
2008

PATRICIA MUZOLON

MICOTOXICOSES EM CÃES

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR

Orientadora: Elizabeth Santin

Curitiba
2008

Muzolon, Patricia

Micotoxicoses em cães / Patricia Muzolon — Curitiba, 2008.

93 f.

Orientadora: Elizabeth Santin.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Cão - Doenças. 2. Micotoxicoses em animais. 3. Micotoxinas. 4. Patologia veterinária. I. Título.

CDU 619.6:636.7

CDD 619.7

TERMO DE APROVAÇÃO

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

UFPR

PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"MICOTOXICOSES EM CÃES"** apresentada pela Mestranda Patricia Muzolon, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Apta para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2008.

Profª Drª Elizabeth Santin
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Membro

Prof. Dr. José Sidney Flemming
Membro

DEDICATÓRIA

À Laurinha, por me dar alegrias, lágrimas e cicatrizes,
e por ter entregue a sua vida pela e para a Ciência.

A todos os “Labras” que com alegria ou receio
permitiram esse estudo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Elizabeth Santin, pela oportunidade concedida, pelo material de apoio fornecido, dedicação ao trabalho, sabedoria sobre o assunto abordado e exemplo profissional. Sobretudo, obrigado Beth por ter me dado a liberdade de trabalhar com cães de forma semi-independente no Laboratório de Ornipatologia da UFPR.

Ao meu co-orientador Fabiano Montiani-Ferreira, pela confiança, dedicação, carinho e compreensão. Agradeço todas as horas de gentileza e atenção durante as intermináveis correções, por toda ajuda durante a experimentação animal, por todas as explicações estatísticas, pela imensa sabedoria, apoio e afeição durante todo esse tempo.

Aos professores da Pontifícia Universidade Católica – Paraná Marconi Farias, Ubirajara Tasqueti, Rita Mangrich e Ricardo Vilani pela oportunidade, apoio, atenção, disposição e realização dos exames, regados de muita confusão e diversão.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR pela elaboração das lâminas de histopatologia de extrema qualidade, em especial à professora Lúcia e às mestrandas Ana Paula, Marina e Milene. E à patologista Juliana Werner, pela sabedoria e disponibilidade em analisar e diagnosticar as lâminas das biópsias hepáticas.

Às funcionárias do Laboratório de Ornipatologia da UFPR Louise e Maristela, por toda dedicação na realização das análises nas amostras de ração.

Às estagiárias e colaboradoras Larissa Condas, Monyque e Paula, pela ajuda no recebimento dos cães, alimentação, medicação, preparação pré-exames, banhos, conversas e diversão. Muito obrigada mesmo, pelo comprometimento, profissionalismo e dedicação com os “Labras”, responsáveis por nossa escolha profissional e amor incondicional. E também aos colaboradores Thais, Leandro e Luiz Rodolfo por toda ajuda e profissionalismo, mesmo que no final.

Aos funcionários Gaudino – PUC-PR e Ismael – Fazenda Cangüiri-UFPR, por toda dedicação e trabalho durante 5 longos meses.

À Kowalski Alimentos, pela imensa doação de ração a cães tão famintos por 5 meses. À Granjinha - Comércio de Rações, pela disponibilidade e entrega da ração. Ao professor Alex Maiorka, pela colaboração quanto à alimentação.

À Alltech do Brasil Agroindustrial pelo substancial financiamento e pelo extremo comprometimento em apoiar a verdadeira ciência. Em especial às funcionárias Andréia Malaguido e Flávia Prieto por toda dedicação pela ciência e pelos animais.

À Biocom e ao veterinário Álvaro pela doação de vacinas.

Á Fundação Araucária pelo apoio financeiro, indispensável para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Ao professor Ivan Deconto pelas dicas e participação no comitê de orientação e pelas valiosas sugestões.

Ao professor José Sidney Flemming pelas observações e correções recheadas de experiência na área de Nutrição Animal e pela participação na banca da defesa.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelo apoio e oportunidade e aos meus colegas da pós-graduação, especialmente minha amiga Mariana Filippi Ricciardi, exemplo de dedicação e conduta, que me acompanhou com muita amizade e doçura desde o início da graduação.

Aos amigos Susana, Evaldo, Adriana, Eudismar, Alissa, Christiano e Margarida, por me convidarem para os almoços de domingo, mesmo após eu ter alimentado e limpado o canil dos cães.

Às mulheres especiais da minha família, minha avó Nelsi, minha mãe Djanira e minha irmã Barbara, pela força, dedicação e trabalho.

E finalmente, aos “Labras”, os cães que me fizeram amar, rir, aprender, estudar, chorar. Anjinhos que fizeram parte da minha vida e que sempre estarão presentes na minha memória. Ao me darem um amor desengonçado e sem interesses, me deram a certeza da minha escolha profissional e do meu desejo de dedicação incondicional por toda a vida. Muito obrigada, meus filhinhos carnívoros.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA – MICOTOXICOSES EM CÃES *(Mycotoxicosis in Dogs)* 18
2.1 - RESUMO 18
2.2 - ABSTRACT 19
2.3 - INTRODUÇÃO 20
2.4 - AFLATOXINAS 22
2.4.1 - TOXICOCINÉTICA 24
2.4.2 - MECANISMO DE AÇÃO 25
2.4.2.1 - EFEITOS GENOTÓXICOS 26
2.4.2.2 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 27
2.4.2.3 - EFEITOS ANTICOAGULANTES 28
2.4.2.4 - EFEITOS IMUNOTÓXICOS 28
2.4.3 - AFLATOXICOSE CLÍNICA 29
2.5 - DEOXINIVALENOL 31
2.5.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS AO DEOXINIVALENOL 32
2.6 - OCRATOXINA A 33
2.6.1 - RESPOSTA CLÍNICA À OCRATOXINA A 34
2.7 - ZEARALENONA 34
2.7.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS À ZEARALENONA 35
2.8 - CITRININA 35
2.8.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS À CITRININA 36
2.9 - MICOTOXINAS TREMORGÊNICAS 37
2.9.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS ÀS MICOTOXINAS TREMORGÊNICAS 37
2.10 - FUMONISINAS 38
2.11 - TRATAMENTO DAS MICOTOXICOSES 39
2.12 - CONCLUSÕES 39
2.13 - REFERÊNCIAS 40

3 CAPÍTULO 1 - AFLATOXICOSE EXPERIMENTAL EM CÃES RETRIEVER DO LABRADOR *(Experimental aflatoxicosis in Labrador Retriever dogs)*..... 47
3.1 - RESUMO..... 47
3.2 - ABSTRACT..... 48
3.3 - INTRODUÇÃO..... 49
3.4 - MATERIAL E MÉTODO..... 51
3.5 - RESULTADOS..... 56
3.6 - DISCUSSÃO..... 58
3.7 - CONCLUSÕES..... 62
3.8 - REFERÊNCIAS..... 63
4 CAPÍTULO 2 – AFLATOXICOSE EXPERIMENTAL EM CÃES RETRIEVER DO LABRADOR – ACHADOS DE NECRÓPSIA EM UM CASO *(Experimental aflatoxicosis in Labrador Retriever dogs – Necropsy Findings in One Case)*..... 74
4.1 - RESUMO..... 74
4.2 – ABSTRACT..... 75
4.3 - INTRODUÇÃO..... 76
4.4 - REVISÃO DA LITERATURA..... 77
4.5 - MATERIAL E MÉTODO..... 79
4.5.1 - HISTÓRICO DO CÃO QUE VEIO A ÓBITO..... 80
4.6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 82
4.7 - CONCLUSÕES..... 85
4.8 - REFERÊNCIAS..... 86
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS MICOTOXINAS DE POTENCIAL TOXICOLÓGICO, RESPECTIVOS FUNGOS PRODUTORES E ÓRGÃOS-ALVO..... 46
TABELA 2 – NÍVEIS DE GARANTIA DA RAÇÃO FORNECIDA AOS CÃES. DADOS FORNECIDOS PELO FABRICANTE..... 68
TABELA 3 – MÉDIAS DAS MICOTOXINAS ANÁLISADAS PELO MÉTODO ELISA, COM USO DE KITS AGRAQUANT® DA ROMERLABS® ESPECÍFICOS PARA CADA MICOTOXINA..... 68
TABELA 4 – EFEITO DA INGESTÃO DE 78,6 µg/Kg DE AFLATOXINA AO FINAL DE 3 MESES QUANTO AOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E URINÁLISE (MÉDIA ± EPM-ERRO PADRÃO MÉDIO)..... 69
TABELA 5 - EFEITO DA INGESTÃO DE 78,6 µg/Kg DE AFLATOXINA AO FINAL DE 3 MESES QUANTO AOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CONTAGEM DO LEUCOGRAMA (MÉDIA ± EPM) 70

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ALT (21 – 102 UI/L). ELEVAÇÃO SIGNIFICATIVA DA ALT AO FINAL DE 3 MESES DE INTOXICAÇÃO.. 70
GRÁFICO 2 – BILIRRUBINA TOTAL (0,1 – 0,5 mg/dL). ELEVAÇÃO SIGNIFICATIVA DA BILIRRUBINA TOTAL AO FINAL DE 3 MESES DE INTOXICAÇÃO..... 71
GRÁFICO 3 - TEMPO DE PROTROMBINA (5,47 – 8,27 segundos). ELEVAÇÃO GRADATIVA DO TEMPO DE PROTROMBINA NO GRUPO AFLATOXINA, DESDE O DIA 30. 71
GRÁFICO 4 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (13,5 – 16,7 segundos). ELEVAÇÃO GRADATIVA DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA NO GRUPO AFLATOXINA, DESDE O DIA 30.. 72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA. (A) GRUPO CONTROLE: REVELANDO LEVE GRAU DE VACUOLAÇÃO GLICOGÊNICA NESTA AMOSTRA DE FÍGADO SAUDÁVEL, COLORAÇÃO HE 400x. (B) GRUPO AFLATOXINA: REVELANDO TRANSFORMAÇÃO GORDUROSA, FIBROSE, NECROSE PERIPORTAL E INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS EM ESPAÇO PERIPORTAL..... 72
FIGURA 2 – IMAGENS DE ULTRA-SONOGRAFIA DEMONSTRANDO CORTES DA REGIÃO DE RECESSO NEFRO-HEPÁTICO. (A) ANIMAL DO GRUPO CONTROLE: REVELANDO ECOGENICIDADE HEPÁTICA SEMELHANTE AO CÓRTEX DO RIM DIREITO - FÍGADO SAUDÁVEL. (B) ANIMAL DO GRUPO AFLATOXINA: EVIDENCIANDO HIPERECOGENICIDADE HEPÁTICA EM RELAÇÃO AO CÓRTEX DO RIM DIREITO, IMAGEM DE FÍGADO COM TRANSFORMAÇÃO GORDUROSA E FIBROSE. 73
FIGURA 3 – LÍQUIDO NA CAVIDADE ABDOMINAL LEVEMENTE OPACO, ESBRANQUIÇADO E ESPUMOSO.. 89
FIGURA 4 – FÍGADO COM COLORAÇÃO PÁLIDA E AMARELADA, BORDAS DOS LOBOS LIGEIRAMENTE ARREDONDADAS PELO LEVE AUMENTO DE TAMANHO, CONSISTÊNCIA FIRME. VESÍCULA BILIAR REPLETA E COM PAREDES LEVEMENTE ESPESSADAS. 89
FIGURA 5 – ESTÔMAGO COM PEQUENA QUANTIDADE DE SUCO GÁSTRICO, AUSÊNCIA DE CONTEÚDO ESTOMACAL ALIMENTAR. MUCOSA ESTOMACAL EDEMACIADA E PRESENÇA DE PETÉQUIAS E EROSÕES GÁSTRICAS..... 90
FIGURA 6 – INTESTINO APRESENTANDO AUSÊNCIA DE CONTEÚDO ALIMENTAR, ESTE SUBSTITUÍDO POR CONTEÚDO HEMORRÁGICO AO LONGO DE TODO O LUME DO ÓRGÃO, DE CONSISTÊNCIA GELATINOSA, APRESENTANDO COÁGULOS SANGÜÍNEOS MISTURADOS AO MUCO ENTÉRICO. A MUCOSA ENTÉRICA ESPESSADA, HIPERÊMICA, COM PETÉQUIAS E MÚLTIPLAS FISSURAS SUGESTIVAS DE EROSÕES ENTÉRICAS. 90
FIGURA 7 – PULMÃO COM PEQUENA ÁREA DE HEMORRAGIA. 91

FIGURA 8 – TIMO APRESENTANDO SUPERFÍCIE COM MÚLTIPLAS PETÉQUIAS. 91
FIGURA 9 – HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA – NOTE A PRESENÇA DE TRANSFORMAÇÃO GORDUROSA, INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS, NECROSE PERIPORTAL E FIBROSE PERIPORTAL. 92
FIGURA 10 - HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA – NOTE PROLIFERAÇÃO DE DUCTOS BILIARES EM UM ESPAÇO-PORTA. 92
FIGURA 11 – HISTOPATOLOGIA INTESTINAL – APRESENTANDO ENTERITE DE FORMA CRÔNICA, ROMPIMENTO DE VILOSIDADES, AUSÊNCIA DE EXTRAVASAMENTO DE ERITRÓCITOS E INFILTRAÇÃO LINFOPLASMOCÍTICA NA LÂMINA PRÓPRIA. 93
FIGURA 12 – SANGUE QUE EXTRAVASOU DOS VASOS APRESENTANDO CONSISTÊNCIA FLUIDA E AUSÊNCIA DE COAGULAÇÃO AO FINAL DA NECROPSIA, CERCA DE 8 HORAS APÓS O ÓBITO. 93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFB_1 – Aflatoxina B_1

AFB_2 – Aflatoxina B_2

AFG_1 – Aflatoxina G_1

AFG_2 – Aflatoxina G_2

AFH_1 – Aflatoxina H_1

AFM_1 – Aflatoxina M_1

AFM_2 – Aflatoxina M_2

AFP_1 – Aflatoxina P_1

AFQ_1 – Aflatoxina Q_1

ALT – Alanina Aminotransferase

ANOVA – Análise de Variância

AST – Aspartato Aminotransferase

cels – Células

dL – Decilitro

DL50 – Dose Letal para 50% da População

DNA – Ãcido Desoxirribonucléico

DON – Deoxinivalenol

EDTA – Ácido Etilendinitrilo Tetraacético

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EPM – Erro Padrão Médio

FDA – *Food and Drug Administration*

g – Grama

G – Guanina

GGT – Gama-glutamil Transferase

h – Hora

HE – Hematoxilina-eosina

HPLC – *High-performance Liquid Chromatography*

Kcal - Quilocaloria

Kg – Quilograma

L – Litro

LDH – Lactato Desidrogenase

µg – Microgramа

mg – Miligramas

min – Minutos

µL – Microlitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

N_7 – Nitrogênio 7

OTA – Ocratoxina A

PUC-PR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

RNA – Ácido Ribonucléico

T – Timina

TLC – *Thin-layer Chromatography*

TP – Tempo de Protrombina

TTPa – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

UI – Unidade Internacional

RESUMO

As micotoxicoses em cães são doenças que comumente ocorrem após a ingestão de produtos fabricados com grãos de cereais contaminados com metabólitos fúngicos. As micotoxicoses já relatadas em cães envolveram as seguintes micotoxinas: aflatoxinas, deoxinivalenol, ocratoxina A, zearalenona, citrinina, roquefortina e penitren A. As conseqüências da ingestão destes compostos dependem da quantidade de toxina, do tempo de exposição e das características inerentes ao tipo de micotoxina. Múltiplas micotoxinas podem ser co-produzidas podendo interagir sinergicamente agravando o quadro clínico ainda mais. Com relação ao sinergismo, pode haver diferentes efeitos simultâneos produzidos por diferentes micotoxinas ou produção de um mesmo efeito, mas de forma exacerbada, dificultando ainda mais a suspeita de uma micotoxicose específica. O diagnóstico definitivo mais comum é feito pela pesquisa de micotoxinas no alimento suspeito, mas a correta mensuração é prejudicada pela distribuição heterogênea das micotoxinas que podem concentrar-se em aglomerados e dificultar a obtenção de uma amostra representativa. As micotoxinas também podem ser produzidas em casa se a ração for armazenada sob umidade. Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento, e por isso a doença pode estar presente, mas silenciosamente, mimetizando muitas outras doenças e confundindo o diagnóstico. As micotoxicoses devem ser incluídas como diagnóstico diferencial de acordo com os órgãos ou sistemas afetados. A Revisão de Literatura apresenta as características das micotoxinas de risco para cães e as intoxicações prévias (experimentais ou acidentais) nessa espécie. O Capítulo 1 descreve a aflatoxicose experimental realizada em cães, relatando os métodos, resultados encontrados e suas correlações com estudos anteriores. O Capítulo 2 descreve os achados da necropsia de um dos cães do experimento que veio a óbito de forma súbita e inesperada, o que possibilitou correlacionar com achados de outros relatos semelhantes. As principais conseqüências verificadas na intoxicação foram alterações de coagulação, pois estavam presentes, mesmo que sem presença de sinais clínicos, desde o primeiro mês de intoxicação e foram responsáveis pelo óbito súbito.

ABSTRACT
Mycotoxicosis in dogs are diseases that occur after ingestion of grain cereal products that have been contaminated by toxic metabolites of fungi. Mycotoxicosis reported in dogs involved aflatoxins, deoxinivalenol, ochratoxin A, zearalenone, citrinina, roquefortina and penitren A. The consequences of their ingestion depend on the amount of toxin, the time of exposure and characteristics of the different types of mycotoxins. Multiple mycotoxins may be co-produced and interact synergistically exacerbating the clinical signs even more. Regarding the synergism there may be different effects produced simultaneously by different mycotoxins or production of the same effect but in a more severe form, further hampering the suspicion and diagnosis of a specific mycotoxicosis. Definitive diagnosis is made by search of mycotoxins in the suspected food, but the choice of the sample is hindered by the heterogeneous distribution of mycotoxins that can concentrate on clusters and hamper the achievement of a representative sample. Mycotoxins may also be produced at home if the dog food is stored under humidity. The clinical signs are nonspecific and include vomiting, depression, polydipsia, polyuria, anorexia, jaundice and reduced growth, and therefore may be present but in a silent form, often mimicking other disease and confusing the diagnosis. The mycotoxicosis should be included as a differential diagnosis in accordance with the organs or systems affected. The Literature Review brings characteristics of mycotoxin risk for dogs and poisoning prior (experimental or accidental) in this specie. Chapter 1 characterizes an experimental aflatoxicosis study performed in dogs, reporting methods, results and their correlation with previous studies. Chapter 2 describes the findings of the necropsy in one dog of the experiment that died suddenly and unexpectedly, allowing the authors to correlate necropsy findings with data of other similar reports. The main consequences of the intoxication were changes in blood coagulation, because they were present, even in the absence of clinical signs, since the first month of poisoning and were responsible for the sudden death of one animal.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxicoses são doenças originadas a partir da ingestão de metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos. As micotoxinas entram no organismo junto com grãos ou alimentos derivados deles. Após absorção hepática e metabolização exercem efeitos deletérios em determinados órgãos. São doenças muito estudadas em animais de produção comercial, como aves e suínos, pois podem gerar perdas econômicas consideráveis.

A micotoxicose mais comum em cães é a aflatoxicose. As aflatoxinas são produzidas nos grãos que farão parte de quase metade da composição da ração de cães, causando uma seqüência de lesões que causam malefícios para a saúde desses animais. Infelizmente a doença pode apresentar sinais clínicos inespecíficos e de forma intermitente, confundindo o veterinário e prejudicando o diagnóstico.

O objetivo desse estudo foi elucidar as conseqüências da intoxicação crônica por aflatoxina, empregando um modelo de experimentação animal com uma dose conhecida por gerar esse protocolo, e assim investigar possíveis sinais clínicos e laboratoriais que sugerissem de forma mais concreta uma aflatoxicose, sempre com a finalidade de alertar proprietários e veterinários para tais conclusões e evitar que outros cães sofressem com diagnósticos insuficientes.

Para isso uma revisão completa da literatura existente foi realizada, para embasamento da experimentação animal e condução do estudo, presente no Capítulo 2.

No Capítulo 3 segue a apresentação da intoxicação experimental, suas particularidades, metodologia e resultados, discutidos e comparados com estudos semelhantes.

Como forma de completar o estudo há no Capítulo 4 uma detalhada descrição dos achados da necropsia de um dos cães do estudo. O óbito deveu-se à intoxicação e ocorreu de forma inesperada.

Por conseguinte seguem as apresentações das considerações finais, no Capítulo 5.

2 REVISÃO DE LITERATURA – MICOTOXICOSES EM CÃES *(Mycotoxicosis in Dogs)*

PATRICIA MUZOLON, FABIANO MONTIANI-FERREIRA, ELIZABETH SANTIN, JOSÉ SIDNEY FLEMMING, LARISSA ANUSKA ZENI CONDAS

2.1 - RESUMO

O objetivo deste texto é apresentar uma revisão da literatura sobre micotoxicoses em pequenos animais, detalhando suas particularidades. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, que geralmente colonizam grãos de cereais, muitos destes usados como ingredientes na formulação da ração de cães. As micotoxicoses já relatadas em cães envolveram aflatoxinas, deoxinivalenol, ocratoxina A, zearalenona, citrinina, roquefortina e penitren A. Os efeitos das micotoxinas estão relacionados à quantidade de toxina ingerida e o tempo de ingestão. Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento. As aflatoxinas são hepatotóxicas, imunodepressoras, nefrotóxicas e carcinogênicas. O deoxinivalenol atinge principalmente o aparelho digestório, causando anorexia, regurgitação, diarréia e hemorragia gastrintestinal. A ocratoxina A é nefrotóxica e induz perda de apetite, vômito, diarréia, paralisia e morte. A zearalenona causa hiperestrogenismo e problemas reprodutivos, como redução da fertilidade, aumento da absorção de embriões e redução do tamanho da ninhada. A citrinina é nefrotóxica e emética, causa perda de peso devido ao vômito, redução da ingestão de alimentos, prostração e morte. As micotoxinas tremorgênicas (roquefortina e penitren A) acometem o sistema nervoso central, causando tremores musculares, convulsões e morte. Na medicina de pequenos animais é comum verificar que as micotoxicoses estão clinicamente presentes mas silenciosamente. A maioria dos sinais das micotoxicoses não é específica e pode confundir o diagnóstico final. As micotoxicoses devem ser incluídas como diagnóstico diferencial de acordo com os órgãos ou sistemas afetados.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxicose, cães, micotoxicoses, toxicidade.

2.2 - ABSTRACT

The objective of this text is to provide a literature review about mycotoxicosis in small animals, detailing particularities of each mycotoxin intoxication reported in these species. Mycotoxins are fungal secondary metabolites that can grow in the ingredients used in dog food, particularly in grains. Micotoxicoses already reported in dogs, either as natural or experimental infections, are aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxina A, zearalenone, citrinin, roquefortine and penitren A. Clinical signs of mycotoxins are related to the amount of toxin ingested and the total period of ingestion. Aflatoxins are hepatotoxic, imunosupressor, nephrotoxic and carcinogenic. Deoxynivalenol reaches the gastrointestinal tract, mainly causing anorexia, regurgitation, vomit, reduction of weight, skin irritation, diarrhea, gastrointestinal hemorrhage, abortion and death. Ochratoxin A is nephrotoxic and induces loss of appetite, vomit, tenesmus, fever, tonsillitis, polydipsia/polyuria, bloody diarrhea, dehydration, paralysis and death. Zearalenone for its estrogenic characteristic causes hyperestrogenism and severe reproductive problems. Citrinin is nephrotoxic and emetic, causing loss of weight, due to vomiting, anorexia, retching, tenesmus, prostration and death. Tremorgenic mycotoxins (roquefortine and penitren A) are produced by fungi of the genus Penicillium, and are simultaneously present in almost all cases, affecting the central nervous system. It is commonly said that mycotoxicosis are silently present in animal medicine. The majority of the signals of micotoxicoses is not specific and can be confused with other diagnoses. Mycotoxicosis are less uncommon than usually accounted for, therefore, they should be included in the differential diagnosis list for diseases affecting its most common target-organs.

KEY WORDS: aflatoxicosis, dogs, mycotoxicosis, toxicity.

2.3 - INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários dos fungos. Os fungos que produzem micotoxinas de importância veterinária crescem em uma ampla variedade de substratos, incluindo grãos e subprodutos de grãos, principalmente milho, trigo, soja e arroz, geralmente usados na formulação da ração de cães. Estima-se que existam mais de 300 diferentes tipos de metabólitos secundários tóxicos produzidos por várias espécies de fungos, mas que apenas 30 deles sejam capazes de causar intoxicações (CAST, 2003).

Os fungos produzem uma imensa variedade de metabólitos secundários com a finalidade de aumentar a sua competitividade na natureza e muitos deles exercem atividades de antibiose (antifúngicas e antibacterianas). Essas propriedades foram reconhecidas desde o descobrimento da penicilina e de sua síntese com função medicinal (FINK-GREMMELS, 2005). Esses metabólitos secundários não possuem função fisiológica conhecida para o próprio fungo, mas têm importância para suas relações com o ambiente como, por exemplo, defesa do fungo frente a competição com outros microorganismos em resposta ao estresse sofrido pela planta (CAST, 2003).

Na verdade as micotoxinas são uma conseqüência do crescimento fúngico. Os fungos produzem micotoxinas quando a planta colonizada está sob condições de estresse, como mudanças bruscas de temperatura, umidade, ventilação e na presença de agentes agressores como insetos, por exemplo (SANTIN, 2005).

Os metabólitos secundários são produzidos quase sempre nos estágios finais da fase de crescimento exponencial. A predisposição das plantas à infestação e colonização por fungos toxicogênicos depende de condições ideais a campo (geralmente alta umidade 20-21%), mas também do estresse e da redução da vitalidade da planta. Em grãos de cereais armazenados a infecção por fungos toxicogênicos bem como a produção de micotoxinas são resultados de uma interação complexa entre umidade (geralmente entre 13-18%), temperatura, substrato, concentrações de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e quantidade de fungos (SANTIN, 2005).

As micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular, possuem alta

lipossolubilidade, são estáveis sob calor intenso e também ativas em baixas concentrações. Nos organismos vivos as micotoxinas não são capazes de induzir imunidade adquirida, ou seja, não conferem proteção à exposição pois não são antigênicas (CAST, 2003).

As micotoxicoses já relatadas em cães envolvem aflatoxinas, deoxinivalenol (vomitoxina), ocratoxina A, citrinina, zearalenona, roquefortina e penitren A (RUMBEIHA, 2000). Os sinais clínicos variam muito e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento, mas a mortalidade é baixa (PATTERSON, 1977).

A maioria dos estudos descritos preocupou-se em descrever os efeitos de micotoxinas isoladas, ignorando a real condição em que múltiplas micotoxinas são co-produzidas e interagem para agravar o quadro clínico (RUMBEIHA, 2000).

A interação entre micotoxinas acontece quando muitos ingredientes são misturados para um produto final ou quando fungos produzem múltiplas micotoxinas simultaneamente (por exemplo, fungos do gênero *Fusarium* e *Penicillium*). Níveis conhecidos e seguros podem ser alterados pela presença de outras micotoxinas. Essa interação pode ser sinérgica ou aditiva. A interação sinérgica ocorre quando os efeitos de diferentes micotoxinas são expressos simultaneamente, os compostos atuam em locais diferentes ou com diferentes mecanismos de ação, mas o quadro clínico resultante da ação combinada é pior do que o causado por apenas uma delas. A interação aditiva ocorre quando diferentes micotoxinas se unem para produzir um efeito e exacerbá-lo, os compostos atuam no mesmo local e com o mesmo mecanismo de ação (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

As interações são complexas e resultam em um conjunto de efeitos característicos que diferem sobremaneira daqueles observados quando se considera uma micotoxina isolada. Este fato resulta em maior dificuldade no diagnóstico e enfatiza a necessidade de identificar as interações, para que se possa reconhecê-las quando se manifestarem (CAST, 2003).

O diagnóstico pode ser feito pela análise do alimento suspeito, realizando a identificação e quantificação das micotoxinas, ou pela análise dos tecidos,

secreções ou excreções dos animais afetados, realizando a detecção dos metabólitos das micotoxinas. Os métodos de identificação e quantificação das micotoxinas são seguros, mas correspondem somente à amostra de alimento analisada naquele momento. Os métodos mais utilizados são o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), e os métodos químicos como a cromatografia em camada delgada (*Thin-layer chromatography* - TLC), cromatografia líquida de alta resolução (*high-performance Liquid Chromatography* - HPLC) e cromatografia gasosa (FIREMAN, 2007).

A amostragem do material suspeito torna-se complicada, pois a distribuição das micotoxinas pode ser altamente heterogênea, elas podem concentrar-se em aglomerados, dificultando ainda mais a obtenção de uma amostra representativa do lote de grãos ou ração (COPPOCK &CHRISTIAN, 2007).

Vale recordar que as aflatoxinas podem ser produzidas em casa quando a ração não é armazenada sob circunstâncias ideais. Como precaução, é melhor adquirir sempre quantidades moderadas de ração, principalmente quando as condições de armazenamento forem inadequadas ou questionáveis (RUMBEIHA, 2000).

O objetivo deste texto é trazer uma revisão do que já foi publicado na literatura científica sobre micotoxicoses em pequenos animais, detalhando particularidades de cada uma das micotoxinas bem como as principais características clínicas de cada intoxicação, buscando assim uma compreensão maior e integrada dos seus efeitos como xenobióticos.

2.4 - AFLATOXINAS

As aflatoxinas são metabólitos altamente tóxicos e carcinogênicos produzidos principalmente pelas espécies de fungos *Aspergillus flavus, A. parasiticus*, *A. nominus* e *Penicilium puberulum*. Esses fungos crescem em diversos cultivos de grãos, como milho, amendoim e semente de algodão (RUMBEIHA, 2000), sob condições ideais de oxigênio, dióxido de carbono, temperatura (12º - 40ºC), atividade água (próxima a 0,99) e equilíbrio ácido-básico (pH 3,5 – 8,0) (SANTIN, 2005).

Adicionalmente, seca, irrigação inadequada e danos por insetos são os principais fatores que causam estresse na planta e a tornam suscetível a invasão fúngica e produção de aflatoxinas a campo (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007). Durante o armazenamento dos grãos o desenvolvimento fúngico é favorecido por fatores como alta umidade (13 – 18%), temperaturas elevadas (20º – 30ºC) má circulação de ar, danos mecânicos no processamento e presença de insetos (SANTIN, 2005). Quimicamente as aflatoxinas são compostos dihidrofuranos ou tetrahidrofuranos ligados a um anel cumarínico (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007). Os principais tipos de aflatoxina são: aflatoxina B_1 (AFB_1), aflatoxina B_2 (AFB_2), aflatoxina G_1 (AFG_1), e aflatoxina G_2 (AFG_2) (B = *blue* - azul e G = *green* - verde, letras relativas a cor da fluorescência sob luz ultra-violeta), e dois produtos metabólitos da AFB_1 e AFB_2, aflatoxina M_1 (AFM_1) e aflatoxina M_2 (AFM_2), isolados primeiramente do leite de animais em lactação alimentados com ração contaminada com aflatoxina (M = *milk* - leite) (CAST, 2003). A aflatoxina B1 tem a maior potência tóxica e é a mais abundante, além de ser a mais pesquisada e estudada. A ordem de toxicidade e abundância é: $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$.

O primeiro relato de aflatoxicose em cães data de 1952 nos Estados Unidos, quando uma ração contaminada por fungos foi considerada a causa da doença hepática em cães, a “hepatite X” (SEIBOLD & BAILEY, 1952; SEIBOLD, 1953). A doença foi reproduzida experimentalmente em 1955 em cães por meio da administração de uma ração comercial (NEWBERNE et al., 1955). Foi apenas após a descoberta das aflatoxinas (ASAO et al., 1963) que correlacionou-se a “hepatite X” à aflatoxicose observada em cães (NEWBERNE et al.,1966). Em 1966 repetiu-se a intoxicação experimental em cães usando aflatoxinas purificadas (NEWBERNE et al., 1966). Desde então, extensiva pesquisa tem sido realizada, particularmente em animais de produção.

As aflatoxinas são hepatotóxicas, imunodepressoras, nefrotóxicas, carcinogênicas e possuem efeito anticoagulante, afetam mamíferos, aves e peixes. Os cães e os gatos são extremamente sensíveis. A DL50 da aflatoxina B_1 nos cães é 0,5-1,0 mg/kg e nos gatos é 0,3-0,6 mg/kg (PATTERSON, 1977).

As rações que contêm concentrações acima de 60 µg/kg de aflatoxina B_1 já

causaram súbito início de aflatoxicose em animais de estimação (NEWBERNE, 1973; KETTERER et al., 1975; BASTIANELLO et al., 1987). A sensibilidade depende da susceptibilidade individual que, por sua vez, depende da idade, estado hormonal (gestação) e estado nutricional, além de outros fatores. Por exemplo, animais de estimação gestantes e jovens são mais sensíveis à toxicidade da aflatoxina B_1 do que adultos ou animais não gestantes (RUMBEIHA, 2000).

A evolução de métodos analíticos, de controle e de proteção dos grãos contra aflatoxinas reduziu bastante a incidência da aflatoxicose em pequenos animais. Nos anos 90 um único episódio de aflatoxicose foi documentado nos Estados Unidos, situação em que vários cães consumiram uma ração contendo de 100 a 300 µg/kg de aflatoxina B_1 por 3-4 meses (DEVEGOWDA & CASTALDO, 2000). Nos anos 80 outro caso de aflatoxicose em cães foi documentado, onde diversos cães morreram subitamente ou seguiram um curto curso clínico na África do Sul (BASTIANELLO et al., 1987). A análise de várias amostras de ração revelou 100-300 µg/kg de aflatoxina B_1. Por outro lado, diversos casos foram relatados em cães, antes dos anos 70, incluindo um caso em que diversos cães morreram em Nova Iorque após serem alimentados com ração comercial que continha 60 µg/kg aflatoxina B_1 (GREENE et al., 1977).

2.4.1 - TOXICOCINÉTICA

As aflatoxinas são eficientemente absorvidas por difusão passiva no trato gastrintestinal e inicialmente passam do intestino delgado à circulação porta-hepática. Muito pouco das aflatoxinas é transferido ao sistema linfático. Os animais jovens absorvem aflatoxinas mais eficientemente que os animais idosos (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

A biotransformação é importante na fisiopatologia da intoxicação por aflatoxinas. O órgão mais importante para biotransformação é o fígado, mas parte dela ocorre também nos rins e no trato intestinal. A maioria das pesquisas envolve o metabolismo da aflatoxina B_1 (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007). BINGHAM et al. (2004) demonstraram que cães que receberam 100 µg/kg de aflatoxina B_1 (AFB_1)

excretaram o metabólito AFM_1 na urina, dentro de 12 horas. Adicionalmente, as aflatoxinas podem ser excretadas no leite, urina, sêmen, bile e fezes (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

Não existem estudos sobre a presença de metabólitos no leite de cadelas e de gatas, nem de seus danos para filhotes, mas em outras espécies a quantidade de metabólitos no leite é muito inferior à quantidade ingerida com o alimento. A porcentagem de metabólitos em relação à quantidade ingerida de aflatoxinas varia de acordo com a espécie, por exemplo em vacas há 0,17% a 3%, em mulheres 0,09% a 0,43%, em ovelhas 0,012% e em porcas cerca de 0,001% (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007). A pequena quantidade de metabólitos disponíveis aos lactentes poderia ser responsável por causar imunossupressão, problemas de crescimento e desenvolvimento, mas futuros estudos são necessários para determinar as reais conseqüências para filhotes.

2.4.2 - MECANISMO DE AÇÃO

O metabolismo de aflatoxinas está intimamente ligado à sua toxicidade e à sua bioativação. Seus principais efeitos metabólicos são inibição da síntese de proteínas, enzimas, fatores de coagulação e ácidos graxos, inibição do metabolismo da glicose, perda do controle de retorno na síntese do colesterol, além de prejudicar o complexo receptor de glucocorticóides (CENTER, 1996).

A biotransformação nos tecidos de mamíferos é realizada primeiramente pelo sistema microssomal de monooxigenases de função mista do citocromo P450, enzimas encontradas em vários tecidos, mas com maior atividade e concentração no fígado, mais especificamente na área centrolobular, principal local de concentração dessas enzimas. Essa capacidade enzimática difere entre animais explicando as grandes variações no metabolismo da aflatoxina entre espécies e entre indivíduos. O metabolismo também é influenciado pelo sexo, idade, higidez e dieta (BISCHOFF & RAMAIAH, 2007).

2.4.2.1 - EFEITOS GENOTÓXICOS

A AFB_1 é metabolizada, em uma reação dependente do P450, em AFB_1 8,9, epóxido, esse metabólito forma adutos com macromoléculas nas células. A formação de adutos é importante na toxicidade das aflatoxinas. Os adutos são complexos formados quando uma molécula química liga-se a uma molécula biológica, como DNA, RNA e/ou proteínas. A afinidade do AFB_1 8,9 epóxido, em ordem decrescente, para as diferentes macromoléculas é: DNA> RNA> proteínas (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

O fato da aflatoxina se ligar ao DNA, com conseqüente inibição da sua replicação e, da transcrição para cadeias de RNA, não implica em perda irreversível da capacidade de sintetizar diferentes tipos de RNA; essa função é progressivamente recuperada, à medida que o complexo DNA-aflatoxina se dissocia. Contudo, a síntese de DNA pode permanecer inibida e pode também ocorrer replicação incompleta. Essa conseqüente modificação na estrutura do DNA pode predispor ao desenvolvimento de neoplasias (CAST, 2003).

O metabólito ativo da AFB_1, o AFB_1-8,9-epóxido, forma uma ligação covalente com o nitrogênio 7 (N_7) da guanina e forma adutos de AFB_1-N_7-guanina nas células alvo (HUSSEIN & BRASEL, 2001). Esse aduto é relativamente resistente aos processos de reparo no DNA. Os adutos de DNA são formas alteradas de DNA que ocorrem como resultado da exposição a carcinógenos. Um aduto de DNA, uma vez formado pode ser eventualmente reparado, resultando no retorno da molécula original de DNA, ou então se mal reparado resultará em uma mutação. Os adutos de proteínas não possuem efeitos biológicos adversos, mas podem ser usados como medida de exposição a substâncias estranhas (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007). Os resultados são transversões de guanina → timina (G→T), danos no DNA, lesões, mutações, e formação de tumores. Por exemplo, o carcinoma hepatocelular em seres humanos foi relacionado à transversão G→T no códon 249 do gene p53, supressor de tumor (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

2.4.2.2 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O aumento da produção de enzimas do sistema P450, pelo seu alto uso, aumenta ainda mais a toxicidade das aflatoxinas. O AFB_1 8,9 epóxido é detoxificado pelas reações da Fase II do metabolismo hepático. Em mamíferos a conjugação mediada por glutation S-transferase é sua principal via de detoxificação. Os outros produtos da biotransformação de AFB_1 são AFQ_1, que pode ser metabolizado a AFH_1. O AFB_1 também é metabolizado à AFP_1, AFM_1 e aflatoxicol. Outras vias da Fase II que reduzem a toxicidade dos metabólitos AFQ_1, AFP_1, AFM_1 e aflatoxicol o fazem conjugando-os com glucoronídeos e sulfatos (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

Os efeitos citotóxicos da AFB_1 estão relacionados com a indução de peroxidação lipídica levando a danos oxidativos nos hepatócitos, resultando em depleção de antioxidantes, necrose celular e indução de apoptose (HUSSEIN & BRASEL, 2001). Existe um equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes nas células responsáveis pela manutenção da imunocompetência, crescimento, desenvolvimento e contra o estresse nutricional, representado principalmente por micotoxinas. Esse equilíbrio é mantido por antioxidantes presentes na dieta, como vitamina E, carotenóides e selênio.

Radicais livres são gerados dentro dos hepatócitos pelo metabolismo oxidativo do citocromo P450, reações de redução e oxidação durante o metabolismo normal, atividade de macrófagos na reposta inflamatória, ação do óxido nítrico gerado também em processos inflamatórios, radiação ionizante e transição de metais como ferro e cobre (BISCHOFF & RAMAIAH, 2007).

As espécies reativas geradas resultam em peroxidação lipídica de membranas, modificação oxidativa de proteínas e lesões dentro do DNA. As membranas plasmática, mitocondrial, do retículo endoplasmático e dos lisossomos sofrem peroxidação dos fosfolipídeos e conseqüente aumento da permeabilidade da membrana, redução da fluidez, inativação das proteínas da membrana e perda da polaridade da membrana mitocondrial (BISCHOFF & RAMAIAH, 2007). A peroxidação lipídica causada pela aflatoxina é acompanhada de redução da concentração de glutation e da atividade de enzimas antioxidantes, como

superóxido dismutase, catalase, glutation peroxidase, glutation S-transferase e glutation redutase (SURAI & DVORSKA, 2005).

Na aflatoxicose as espécies reativas de oxigênio participam da indução e da execução de apoptose celular. A depleção de glutation também induz apoptose celular (SURAI & DVORSKA, 2005).

2.4.2.3 - EFEITOS ANTICOAGULANTES

As alterações de coagulação estão relacionadas à estrutura química das aflatoxinas, que se comportariam como cumarínicos, exercendo um efeito anticoagulante. A ação básica dos cumarínicos é de antagonismo da vitamina K. No hepatócito, os fatores dependentes da vitamina K passam a ser sintetizados de modo incorreto e são incapazes de serem ativados convenientemente. É como se a protrombina não tivesse sido sintetizada. Os cumarínicos inibem os fatores da via de coagulação extrínseca (fatores V, X, protrombina e fibrinogênio).

O efêmero epóxido da AFB_1 foi associado com coagulopatias devido a uma redução na síntese de vitamina K e de outros fatores de coagulação, como resultado da intoxicação experimental subletal de animais (BABABUNMI et al. 1997).

2.4.2.4 - EFEITOS IMUNOTÓXICOS

Nas populações animais que por ventura ingerirem alimentos contaminados com uma quantidade considerável de aflatoxinas, uma série de problemas de saúde pode aflorar. Por exemplo, a resistência natural a doenças fica reduzida e a proteção das vacinas também pode ficar prejudicada. Os sinais clínicos aparentes da aflatoxicose podem, portanto, estar limitados apenas ao aumento da ocorrência e da severidade de doenças infecciosas. A recuperação das doenças infecciosas pode ser prolongada e necessitar de outros tratamentos. As provas das disfunções imunológicas são as infeções freqüentes causadas por organismos que geralmente não são patogênicos (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

A aflatoxina é uma agente imunomodulador que atua primeiramente na imunidade celular e na função de células fagocíticas, pois reduz a atividade de

linfócitos e pode afetar macrófagos que auxiliam linfócitos (SURAI & DVORSKA, 2005).

O estresse oxidativo causado pelo consumo de aflatoxinas seria responsável por quebrar a comunicação entre células imunes. Essas células contêm altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e receptores sensíveis na superfície celular que seriam importantes alvos do ataque de radicais livres. Estes causam danos nos receptores e diminuição das moléculas comunicantes produzidas por macrófagos, como citocinas e eicosanóides. Isso desregularia o sistema imune gerando imunossupressão (SURAI & DVORSKA, 2005).

A expressiva inibição das sínteses de RNA, DNA e proteínas também é responsável pela ação imunossupressora das aflatoxinas, assim como sua capacidade de induzir e acelerar a apoptose em linfócitos (SURAI & DVORSKA, 2005). O resultado é redução da produção de anticorpos e os animais não responderão às imunizações regulares (RUMBEIHA, 2000).

2.4.3 - AFLATOXICOSE CLÍNICA

A aflatoxicose clínica em cães pode ser classificada como aguda, subaguda, ou crônica. A aflatoxicose aguda ocorre quando os cães são alimentados com grandes quantidades de aflatoxina B_1 (> 1 mg/kg na dieta) (NEWBERNE et al., 1966). Geralmente, um cão afetado vomita dentro de horas após a ingestão do alimento contaminado, seguido por anorexia, severa depressão, sede e polidipsia, poliúria e a morte ocorre dentro de três dias desde o início dos sinais. O fígado é o primeiro órgão alvo, ocorrendo então icterícia e bilirrubinúria. Há elevação significativa de enzimas séricas hepáticas, pela lesão de hepatócitos e extravasamento delas, especialmente alanina aminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT), e Lactato Desidrogenase (LDH) (NEWBERNE et al., 1966). Outra observação significativa é coagulação intravascular disseminada, que ocorre geralmente no paciente terminal. A hemorragia ocorre em cavidades do corpo e em superfícies da submucosa e subserosa. Há também o aparecimento de hematoquesia e hematemese (GREENE et al., 1977). A alteração de coagulação é caracterizada pela

hipofibrinogenemia, aumento dos tempos de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (TTPa), e severa trombocitopenia. Por causa da hemorragia, geralmente os cães estão anêmicos. A febre não é uma característica de aflatoxicose em animais de estimação.

Os casos subagudos em animais de estimação ocorrem depois da exposição a quantidades moderadas da aflatoxina B_1 em algumas semanas (2-3). Os cães ou os gatos afetados irão apresentar-se com letargia, anorexia, poliúria, polidipsia, elevação das enzimas hepáticas e icterícia. A morte se dá em muitos casos por coagulação intravascular disseminada. As concentrações dietéticas de 0,5-1,0 mg/kg de aflatoxina B_1 podem causar estes sinais (NEWBERNE et al., 1966). Na ocasião da necropsia o fígado geralmente está aumentado, pálido e amarelado (NEWMAN et al., 2007).

A aflatoxicose crônica é causada pelo consumo, continuado ou intermitentemente, de dietas que contêm pequenas a moderadas quantidades de aflatoxinas. O consumo de concentrações dietéticas da aflatoxina B_1 entre 50 e 300 µg/kg em um período de 6-8 semanas pode causar aflatoxicose crônica. Os animais terão os sinais letargia, anorexia, poliúria, polidipsia, icterícia proeminente e aumento de enzimas hepáticas (NEWBERNE et al., 1966; KETTERER et al., 1975).

A ingestão crônica de baixas quantidades de aflatoxina B_1 na alimentação (20-100 µg/kg) também pode causar imunossupressão, seguida por sinais clínicos não específicos, incluindo susceptibilidade aumentada a infecções virais, bacterianas, fúngicas ou parasitárias (NEWBERNE et al., 1966; KETTERER et al., 1975). Não raramente observa-se cirrose hepática à necropsia (NEWMAN et al., 2007).

A melhor maneira de distinguir entre aflatoxicose aguda, subaguda, e crônica é por meio da histologia (BASTIANELLO et al., 1987). Tal classificação estima o grau de doença, mas essa diferenciação não confere alta precisão, pois a apresentação da intoxicação é subordinada a particularidades de cada indivíduo.

Na aflatoxicose aguda o fígado está edemaciado. Histologicamente há severa degeneração gordurosa com nítida vacuolização dos hepatócitos. Há

hiperplasia dos ductos biliares e as veias portal e central estão congestas (RUMBEIHA, 2000). A microscopia eletrônica revelou vacuolização lipídica e início de fibroplasia (NEWMAN et al., 2007).

Em casos subagudos, o fígado também pode estar edemaciado e com lipidose hepática. Histologicamente, a característica diferencial é a hiperplasia dos ductos biliares, e há evidência de regeneração hepática e fibroplasia portal (RUMBEIHA, 2000; NEWMAN et al., 2007).

Nos casos crônicos há extensa fibrose hepática e hiperplasia do ducto biliar. Os cães afetados cronicamente apresentam microhepatia, também chamada de *microhepatica*, devido à fibrose (NEWBERNE et al., 1966). Pode ocorrer também acentuada atrofia lobular, fibrose portal formando pontes fibróticas e nódulos de regeneração hepatocelular. A microscopia eletrônica revelou acentuada fibrose e regeneração hepatocelular (NEWMAN et al., 2007).

Outro efeito em longo prazo das aflatoxinas é o câncer. A exposição a uma grande quantidade de aflatoxinas tem o potencial de levar ao câncer hepático nos animais de estimação que se recuperaram dos efeitos da exposição aguda, subcrônica, ou crônica. Conseqüentemente, a exposição às aflatoxinas pode ter implicações em médio ou longo prazo na saúde desses animais (RUMBEIHA, 2000).

2.5 - DEOXINIVALENOL

O deoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, é um membro dos tricotecenos, grupo de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium spp*, geralmente encontrados no milho (RUMBEIHA, 2000). Essa micotoxina foi inicialmente detectada em 1972 no milho que causou vômito e recusa da alimentação em suínos. Posteriormente, informações importantes sobre a intoxicação em pequenos animais também foram publicadas (HUGHES et al. 1999).

Os sinais clínicos de toxicidade aguda de DON em animais de companhia incluem anorexia, regurgitação, vômito, irritação cutânea, diarréia, hemorragias, aborto (mamíferos) e até a morte (RUMBEIHA, 2000). A intoxicação por DON

também pode causar redução de peso, emese e diarréia. A hemorragia gastrintestinal é um sinal agudo, enquanto que perda de peso e de apetite são seqüelas mais crônicas (PUSCHNER, 2002).

Bioquimicamente o DON, à semelhança da aflatoxina, causa inibição da síntese de proteínas, de DNA e conseqüentemente, morte celular. Por este mesmo motivo, o DON é imunossuppressor (predispõe animais afetados a doenças infecciosas) e ainda causa redução no crescimento. (RUMBEIHA, 2000; PUSCHNER, 2002). O nível máximo permitido de DON na ração de cães é de 0,5 mg/kg (BIRD, 2000).

A redução do apetite e a anorexia, causadas pela ingestão de DON em suínos, foram relacionadas a alterações do líquido cérebro-espinhal, indicando elevação anormal da serotonina cerebral, hormônio este, responsável pela sensação de prazer e saciedade após alimentação (SMITH et al., 2005).

2.5.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS AO DEOXINIVALENOL

HUGHES et al. (1999) demonstraram que o processo de extrusão não destrói o DON. Conseqüentemente a utilização de milho contaminado por DON resultará em sua presença na ração. Os pesquisadores expuseram cães a uma ração comercial contendo DON variando de 0 a 10 mg/kg. O achado mais significativo foi a recusa da alimentação pelos cães que receberam ração com mais de 4,5 mg/kg de DON. Os gatos também foram estudados e demonstraram-se menos sensíveis que os cães, pois a recusa da alimentação foi observada apenas em concentrações acima de 7,7 mg/kg de DON. A presença de vômito em cães e gatos ocorreu em concentrações acima de 8 a 10 mg/kg. Estes resultados sugerem que cães podem ser quase tão sensíveis quanto suínos (concentrações acima de 1 mg/kg originam uma redução da ingestão de alimentos em suínos) no que diz respeito à recusa da alimentação (RUMBEIHA, 2000).

O principal efeito de DON em cães foi a redução da alimentação e perda de peso corpóreo, mas também pode ocorrer gastrenterite hemorrágica. Quando a ração contiver cereais na sua constituição, o DON deve estar na lista de diagnóstico diferencial. Os fungos do gênero *Fusarium* têm uma tendência de

produzir múltiplas toxinas como T-2, HT-2 e zearalenona. A T-2 e a HT-2 são micotoxinas muito irritantes e têm o potencial de interagir sinergicamente com DON e exacerbar os principais sinais (RUMBEIHA, 2000).

2.6 - OCRATOXINA A

As ocratoxinas são produzidas pelos fungos *Penicillium* e *Aspergillus*, principalmente por *P. verrucosum e A. ochraceus* (RUMBEIHA, 2000; CHU, 2002). Essas são espécies de fungos de armazenamento mas que também podem crescer no campo. Conseqüentemente, esses fungos têm potencial de produzir ocratoxinas em casa, após a compra da ração, se ela não for armazenada adequadamente (RUMBEIHA, 2000).

A ocratoxina A (OTA) foi isolada de cereais como o milho, aveia, trigo e cevada (RUMBEIHA, 2000), mas também pode ser encontrada em produtos de origem animal, devido a sua estreita ligação com proteínas plasmáticas e longa permanência em tecidos animais (LEUNG et al., 2006).

O mecanismo de ação da ocratoxina está relacionado ao seu acúmulo nos rins, pelo alto fluxo sangüíneo e pela reabsorção tubular (PETZINGER & ZIEGLER, 2000). Sugere-se que ela quebre o metabolismo da fenilanina CAST, (2003), cause um ataque eletrofílico no DNA, por ter um radical de fenol clorado (grupo pró-carcinogênico) GUNSEN & YAROGLU, (2002) e também interfira com sinais das vias de transdução, em concentrações nanomoleculares nas células renais, levando a mudanças específicas de função e fenótipo, mas não à necrose (GEKLE et al., 2005).

Pesquisas revelaram alta freqüência na presença de OTA na ração de cães e gatos e também foi encontrada em amostras de rins de gatos, mas nenhuma correlação foi encontrada entre a presença de OTA e os achados histopatológicos nos rins (RAZZAZI-FAZELI et al., 2001). Na Europa, a OTA está envolvida com a nefropatia endêmica dos Balcãs. A OTA é também um potente carcinógeno em roedores (RUMBEIHA, 2000).

2.6.1 - RESPOSTA CLÍNICA À OCRATOXINA A

Assim como em outras espécies, o rim é o primeiro órgão alvo da ocratoxicose em cães. SZCZECH et al. (1973a,b; 1974), em um estudo sobre a ocratoxicose em cães da raça Beagle, revelaram a alta sensibilidade dos cães à esta toxina. Com a dose oral de 0,2 a 0,3 mg/kg, o óbito ocorreu dentro de 10 a 14 dias de intoxicação. Os sinais observados foram perda de apetite, vômito, tenesmo, hipertermia, tonsilite, diarréia sanguinolenta, polidipsia, poliúria, desidratação, paralisia e morte. Os achados de necropsia foram rins pálidos, tonsilas hiperêmicas, enterite sanguinolenta no íleo, ceco, cólon e reto, linfonodos edemaciados, hiperêmicos e parcialmente necróticos. Histologicamente observa-se descamação e necrose do epitélio dos túbulos renais proximais e ainda dilatação e proliferação do retículo endoplasmático das células do epitélio dos túbulos proximais.

KITCHEN et al. (1997a, b, c) conduziram outro estudo com cães, com dose oral de 0,2 a 0,3 mg/kg por duas semanas, e revelaram sinais semelhantes aos encontrados no estudo acima. A mínima dose tóxica, via oral, foi de 0,2 mg/kg e logo após a administração, os cães tornaram-se agitados com a respiração ofegante, prostrados e vomitaram dentro de 15 a 20 minutos. Outros sinais foram anorexia, ansiedade e engasgos. À necropsia tais cães revelaram necrose dos tecidos linfóides no baço, tonsilas, timo e linfonodos periféricos. A adição de citrinina aumentou a taxa de mortalidade e piorou a gravidade dos sinais, revelando um efeito sinérgico entre essas micotoxinas.

2.7 - ZEARALENONA

A zearalenona é um metabólito fúngico de espécies do gênero *Fusarium*, produzida principalmente por *F. graminearum*, sua produção é favorecida por elevada umidade e baixas temperaturas (CAST, 2003). Trata-se de uma micotoxina com atividade estrogênica, demonstrada em porcas como causa de vulvovaginite e outras respostas estrôgenicas. Os suínos foram a espécie mais estudada pois são especialmente sensíveis a essa micotoxina e sua ingestão,

além do hiperestrogenismo, pode causar graves problemas reprodutivos (GOLINSKI & NOWAK, 2004).

A zearalenona liga-se aos receptores de estrogênio influenciando a transcrição dependente desse hormônio no núcleo da célula (KOLB, 1984). Basicamente a zearalenona e seus metabólitos podem ligar-se diretamente aos receptores de estrogênio no citoplasma e deslocar os receptores para o núcleo. No núcleo a estimulação do RNA leva a síntese protéica e aos sinais clínicos de hiperestrogenismo (MOSTROM, 2007).

2.7.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS À ZEARALENONA

As respostas fisiológicas ocorrem em suínos quando o nível de zearalenona na ração excede aproximadamente 1 mg/kg, quando já pode ser transmitida aos leitões pelo leite das porcas, causando estrogenismo nos leitões (CAST, 2003).

Ela causa alterações no trato reprodutor de vários animais. Os efeitos observados em cães foram redução da fertilidade, aumento de absorção de embriões, redução do tamanho da ninhada, alterações dos níveis séricos de progesterona e estradiol e alterações no peso da adrenal, tireóide e hipófise (GOLINSKI & NOVAK, 2004). Em cães intoxicados experimentalmente houve redução do número de corpos lúteos após treze semanas de ingestão de zearalenona diária de 1 mg/kg (HIDY et al., 1977).

Nos seres humanos, a zearalenona mostrou-se capaz de estimular o crescimento de células epiteliais neoplásicas da mama contendo receptores responsivos ao estrogênio (AHAMED et al., 2001; WITHANAGE et al., 2001). Não seria totalmente inconcebível extrapolar este efeito carcinogênico para cadelas.

2.8 - CITRININA

A citrinina é um metabólito de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, principalmente *P. citrinum, A. ochraceus, P. verrucosum*. A citrinina pode ser sintetizada junto com ocratoxina A, pois ambas são metabólitos de fungos semelhantes. Os rins são os órgãos alvo na intoxicação pela citrinina. Entretanto, a citrinina é 10 vezes menos nefrotóxica que a OTA.

Os cães intoxicados experimentalmente por citrinina apresentaram tenesmo, secreção nasal e lacrimejamento profusos (CARLTON et al., 1974; KITCHEN et al., 1977a). A citrinina é um emético muito forte em cães. Parece improvável que a citrinina possa causar uma intoxicação isoladamente, pois essa toxina é um irritante gástrico e, portanto, induz prontamente os mecanismos de proteção gástrica que incluem a emese e a recusa em se alimentar (RUMBEIHA, 2000).

2.8.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS À CITRININA

O sinal clínico mais evidente em cães que receberam 5 ou 10 mg/kg de citrinina, durante 14 dias, foi perda do peso, devido ao vômito e a recusa na alimentação, mas também houve anorexia, engasgos, tenesmo, aumento da LDH, prostração e morte. A urinálise revelou cilindros celulares e granulares, cetonúria, proteinúria e glicosúria (KITCHEN et al., 1977a). A necropsia revelou peritonite local e intussuscepção intestinal. A histopatologia renal revelou degeneração e necrose com descamação do epitélio tubular, primeiramente no segmento reto dos túbulos proximais (KITCHEN et al., 1977b). Já o experimento de KOGIKA et al. (1993), em que cães receberam 10 mg/kg de citrinina por dois dias e foram avaliados pelos 15 dias subseqüentes, revelou lesões renais nos túbulos proximais contorcidos, proteinúria, glicosúria e muitos cilindros granulares. A glicosúria e proteinúria foram observadas nos primeiros 5 dias, enquanto que a cilindrúria foi observada nos primeiros 15 dias. Houve elevação da uréia sangüínea e da creatinina dos dias 2 ao 5, demonstrando que a taxa de filtração glomerular foi afetada. A urinálise é uma ótima forma de avaliar a nefrotoxicidade pois a maioria das nefrotoxinas age inicialmente nos túbulos contornados proximais.

A dose diária de 40 mg/kg de citrinina, foi causa da morte de dois cães após três dias, os outros cães foram submetidos à eutanásia pois estavam agonizando. Havia elevação da uréia sangüínea, diminuição da gravidade específica, glicosúria, leve proteinúria e cilindros urinários. A necropsia revelou rins pálidos e

edematosos. A histopatologia apresentou necrose do epitélio tubular renal (CARLTON et al., 1974).

2.9 - MICOTOXINAS TREMORGÊNICAS

A roquefortina e o penitren A são duas micotoxinas tremorgênicas importantes para animais de companhia. O penitren A é produzido por fungos do gênero *Penicillium*, principalmente *P. crustosum*. Este fungo cresce em cereais e na matéria orgânica em decomposição.

A roquefortina também é produzida por fungos do gênero *Penicillium*. Originalmente pensou-se que era produzido apenas pelo *P. roqueforti* um fungo usado na manufatura do queijo gorgonzola, mas diversas outras espécies de *Penicillium* foram recentemente identificadas produzindo essa micotoxina em muitos substratos como grãos, sopa estragada e lixo. Conseqüentemente podem ser classificados como fungos de armazenamento, pois podem crescer na ração de cães armazenada inadequadamente.

O penitren A e a roquefortina são produzidos simultaneamente em quase todos os casos. Os fungos que produzem essas micotoxinas desenvolvem-se nos cereais usados na produção de ração para cães, assim é importante que as fábricas de ração estejam cientes dos perigos dessas micotoxinas (RUMBEIHA, 2000).

2.9.1 - RESPOSTAS CLÍNICAS ÀS MICOTOXINAS TREMORGÊNICAS

Os sinais clínicos associados a micotoxicoses tremorgênicas em cães incluem fraqueza, tremores musculares, irritabilidade, rigidez, hiperatividade, febre, ataxia, convulsões e morte (PULS & LADYMAN, 1988; HAYES et al., 1976). Exaustão pode seguir uma intensa atividade muscular, ocorre aumento da AST e da creatinina quinase, hipertermia e desidratação. A presença de vômito geralmente precede os sinais neurológicos (LOWES et al., 1992; HOCKING et al., 1988). Essa doença é freqüentemente mal diagnosticada como envenenamento por estriquinina, por pesticidas ou por outros compostos que podem causar tremores e convulsões em cães (RUMBEIHA, 2000).

O penitren A é uma potente micotoxina tremorgênica. Segundo HAYES et al. (1976), a dose mais baixa que causou tremores em cães foi 0,125 mg/kg e os cães tiveram recuperação completa. Altas doses orais de penitren A (maiores de 2,5 mg/kg) causaram necrose hepática com elevação das enzimas de extravasamento hepáticas, principalmente a LDH e ALT. Há também um aumento da creatinina quinase, provavelmente como conseqüência dos tremores musculares. A intoxicação por roquefortina e/ou por penitren A têm sido freqüentemente encontradas e relatadas na prática clínica nos Estados Unidos e Europa (RUMBEIHA, 2000). Todavia, os mecanismos de ação dessas micotoxinas tremorgênicas ainda não foram pesquisados.

2.10 - FUMONISINAS

As fumonisinas são metabólitos tóxicos produzidos por *Fusarium verticillioides* e não existem relatos de sua intoxicação em pequenos animais (CAST, 2003). Todavia, o seu potencial para causar intoxicação é considerável pois são micotoxinas geralmente encontradas no milho que pode fazer parte da formulação de rações para pequenos animais. Essas micotoxinas já foram envolvidas em casos de edema pulmonar em suínos e leucoencefalomalácia em eqüinos. Experimentalmente a fumonisina demonstrou causar danos hepáticos em suínos, eqüinos, bovinos, coelhos e primatas, assim como a toxicidade substancial em órgãos-alvo dependendo da espécie, por exemplo, pulmão em suínos, cérebro em eqüinos, rins em ratos, coelhos e ovinos e esôfago em ratos e suínos (SMITH, 2007).

Dados epidemiológicos também correlacionaram a ingestão de milho contaminado com *F. verticillioides* à neoplasia de esôfago em seres humanos, além de fumonisinas serem hepatocarcinogênicas em ratos e camundongos. Frangos e perus também são sensíveis e apresentam redução no ganho de peso, diarréia e hepatotoxicidade (SMITH, 2007).

2.11 - TRATAMENTO DAS MICOTOXICOSES

O tratamento das micotoxicoses baseia-se fortemente em protocolos terapêuticos sintomatológicos e de suporte, de acordo com os sinais apresentados, aparelhos ou sistemas afetados, pois ainda não há um tratamento específico contra as micotoxicoses. Há grande variação individual com relação à severidade da intoxicação. Portanto, o tratamento pode variar de acordo com a gravidade das lesões nos principais órgãos acometidos (TABELA 1) e para cada paciente. Deve-se, certamente, excluir da dieta todo alimento suspeito e uma alimentação segura deve ser instituída. Adicionalmente, ao que tudo indica, a suplementação com colina, metionina e n-acetilcisteína pode ser benéfica (CULLEN & NEWBERNE, 1994).

A prevenção certamente ainda é a melhor alternativa. O cuidado com a alimentação é o principal ponto crítico de controle. Sabe-se por exemplo, que os animais que recebem uma dieta com baixo teor protéico são mais suscetíveis à ação das micotoxinas (CULLEN & NEWBERNE, 1994).

2.12 - CONCLUSÕES

O fornecimento de rações comerciais balanceadas em larga escala para cães e gatos é uma prática relativamente recente no Brasil comparativamente aos outros países mais desenvolvidos. A população brasileira economicamente menos favorecida ainda está aprendendo sobre a qualidade das rações comerciais e muitas vezes optam em adquirir rações de baixa qualidade e de procedência questionável. A importância das micotoxicoses é imensa na medicina de pequenos animais, envolvendo o controle de práticas de vários segmentos como agricultura, produção industrial de alimentos, transporte, armazenamento e, finalmente, clínica médica *"per se"*. Todavia, acredita-se que, apesar de ser uma entidade clínica conhecida, a micotoxicose é ainda pouco discutida e considerada quando o clínico depara-se com cães ou gatos apresentando hepatopatias aguda, subaguda ou crônica. Uma possível explicação para isso seria o caráter insidioso da intoxicação. Adicionalmente, a detecção das micotoxinas na ração é raramente solicitada por clínicos de pequenos animais, salvo na medicina forense, depois de

surtos nos quais um grande número de animais foi intoxicado. Múltiplas micotoxinas podem estar presentes quando diferentes ingredientes contaminados são empregados na formulação de uma ração. Quando uma micotoxina é encontrada, deve-se considerar que outras micotoxinas de grupos diferentes também podem estar presentes na dieta. Devido a ação sinérgica no organismo, uma quantidade relativamente inerte de uma dada micotoxina poderá aumentar o potencial toxicológico, quando houver presença de outras micotoxinas.

As micotoxicoses devem, portanto, fazer parte do diagnóstico diferencial das várias doenças e insuficiências orgânicas em pequenos animais, pois cada uma delas tem potencial de causar lesões em órgãos e sistemas específicos (TABELA 1).

2.13 - REFERÊNCIAS

AHAMED,S.; FOSTER,J.S.; BUKOVSKY,A.; WIMALASENA,J. Signal transduction through the ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.30, p.88-98, 2001.

ASAO,T.; BUCHI,G.; ABDEL-KADER,M.M.; CHANG,S.B.; WICK,E.L.; WOGAN,G.N. Aflatoxins B and G. **Journal of American Chemistry Society** , v.85, p.1706-1707, 1963.

BABABUNMI,E.A.; THABREW,I.; BASSIR,O. Aflatoxin induced coagulopathy in different nutritionally classified animal species. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.34, p.161-181, 1997.

BASTIANELLO,S.S.; NESHIT,J.W.; WILLIAMS,M.C.; LANGE,A.L. Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.54, p.635-640, 1987.

BINGHAM,A.K.; HUEBENER,H.J.; PHILILIPS,T.D.; BAUER,J.E. Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1851-1858, 2004.

BIRD, C. Detecting and Controlling Mycotoxins in Pet-foods. **Technical Symposium on Mycotoxins**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

BISCHOF,K.; RAMAIAH,S.K. Liver Toxicity. In: GUPTA,R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, 2007, p. 145 - 160.

CARLTON,W.W.; SANSING,G.; SZCZECH,G.M. Citrinin mycotoxicosis in beagle dogs. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.12, p.479-490, 1974.

CAST, Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems.** Ames: Task Force Report nº139, 2003. 199p.

CENTER,S.A. Pathophysiology of Liver Disease: Normal and Abnormal Function. In: STROMBECK,D.R.; CENTER,S.A; GUILFORD,W.G.; WILLIAMS,D.A.; MEYER,D.J. **Small Animal Gastroenterology.** 3.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996b, p.553-632.

CHU,F,S. Mycotoxins. In: CLIVER,D.O.; RIEMANN,H. **Foodborne Diseases**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 271-303.

COPPOCK,R.W.; CHRISTIAN,R.G. Aflatoxins In: GUPTA,R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, 2007, p. 939-950.

CULLEN,J.M.; NEWBERNE,P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON,D.L.; GROOPMAN,J.D. **The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance.** Toronto:Academic Press, 1994, p.3-26.

DEVEGOWDA,G.; CASTALDO,D. Mycotoxins: Hidden killers in pet foods. Is there a biological solution? **Technical Symposium on Mycotoxins**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

FINK-GREMMELS,J. Mycotoxins in Forages. In: DIAZ,D. **The Mycotoxin Blue Book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005, p.229-268.

FIREMAN,A. Micotoxinas - A Importância do Gerenciamento, dos Métodos Diagnósticos Corretos e da Escolha do Produto Certo Para Evitar seus Efeitos Deletérios Sobre a Produção Animal. **Produção Animal – Avicultura**, 2007.

GEKLE,M.; SAUVANT,C.; SCHWERDT,G. Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. **Molecular Nutricional Food Research**, v.49, p.118-139, 2005.

GOLINSKI,P.K.; NOWAK,T. Dietary origin of mycotoxins with estrogenic potential and possible health implications to female dogs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**., v.7, p.337-341, 2004.

GREENE, C.E.; BARSANTI,J.A.; JONES,B.D. Disseminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. **The Cornell Veterinarian**, v.67, p.29-49, 1977.

GUNSEN,U.; YAROGLU,T. Aflatoxin in dog and horse feeds in Turkey. **Veterinary and Human Toxicology**, v.44, p.113-114, 2002.

HAYES,A.W.; PRESLEY,D.B.; NEVILLE,J.A. Acute toxicity of penitren A in dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.35, p.311-320, 1976.

HIDY,P.H.; BALDWIN,R.S.; GREASHAM,R.L.; KEITH,C.L.; MCMULLEN,J.R. Zearalenone and some derivates: Production and biological activities. In: PERLMAN,D. **Advances in Applied Microbiology**. New York: Academic Press, 1977, p.59-82.

HOCKING,A.D.; HOLDS,K.; TOBIN,N.F. Intoxication by tremorgenic mycotoxin (penitren A) in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v.65, p.82-85, 1988.

HUGHES,D.M.; GAHL,M.J.; GRAHAM,C.H.; GRIEB,S.L. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. **Journal of Animal Science**, v.77, p.693-700, 1999.

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

KETTERER,P.J.; WILLIAMS,E.S.; BLANEY,B.J.; CONNOLE,M.D. Canine aflatoxicosis. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.355-357, 1975.

KITCHEN,D.N.; CARLTON,W.W.; TUITE,J. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs: I. Clinical and Clinicopatbological features. **Veterinary Pathology** , v.14, p.154-172, 1977a.

KITCHEN,D.N.; CARLTON,W.W.; TUITE,J. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs: II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v.14, p.261-272, 1977b.

KITCHEN,D.N.; CARLTON,W.W.; HINSMAN,E.J. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs: III. Terminal renal ultrastructural alterations. **Veterinary Pathology**, v.14, p.392-406, 1977c.

KOGIKA,M.M.; HAGIWARA,M.K.; MIRANDOLA,R.M. Experimental citrinin nephrotoxicosis in dogs: renal function evaluation. **Veterinary Human Toxicology**, v.35, n.2, p.136-140, 1993.

KOLB,E. Recent knowledge on the mechanism of action and methabolism of mycotoxins. **Zeitschrift für die gesamte innere Medizin und ihre Grenzgebiete**, v.39, p.353-358, 1984.

LEUNG,M.C.K; DÍAZ-LLANO,G.; SMITH, T.K. Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.9623-9635, 2006.

LOWES,N.; SMITHAND,R.A.; BECK,B.E. Roquefortine in the stomach contents of dogs suspected of strychnine poisoning in Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, v.33, p.5819-5828, 1992.

MOSTROM,M.S. Zearalenone. In: GUPTA,R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, 2007, p. 977-982.

NEWBERNE,P.M. Chronic aflatoxicosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.163, p.1262-1267, 1973.

NEWBERNE,J.W.; BAILEY,W.S.; SEIBOLD,H.R. Notes on a recent outbreak and experimental reproduction of hepatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.127, p.59-62, 1955.

NEWBERNE,P.M.; RUSSO,R.; WOGAN,G.N. Acute toxicity of aflatoxin B1 in the dog. **Pathologia Veterinaria**, v.3, p.331-340, 1966.

NEWMAN,S.J.; SMITH,J.R.; STENSKE,K.A.; NEWMAN,L.B.; DUNLAP,J.R.; IMERMAN,P.M.; KIRK,C.A. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.168-175, 2007.

PATTERSON,D.S.P. Toxin-producing fungi and susceptible animal species. In: WYLLIE,T.D.; MOREHOUSE,L.G. **Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Micotoxicosis Vol 1.** New York:Marcel Dekker Inc,1977, p. 156-158.

PETZINGER,E.; ZIEGLER,K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.23, p.91-98, 2000.

PULS,R.; LADYMAN,E. Roquefortine toxicity in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.569, 1988.

PUSCHNER,B. Mycotoxins. **Veterinary Clinics of Small Animal**. v.32, p.409-419, 2002.

RAZZAZI-FAZELI,E.; BÖHM,J.; GRAJEWSKI,J.; SZCZPANIAK,K.; KÜBBER-HEISS,A.; IBEN,I. Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.85, p.212-216,2001.

RUMBEIHA,W.K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

SANTIN,E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ,D. **The Mycotoxin Blue Book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005, p.225-234.

SEIBOLD,H.R.; BAILEY,W.S. An epizootic of hepatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.121, p.201-206,1952.

SEIBOLD,H.R. Hepatitis X in dogs. **Veterinary Medicine**, v.48, p.242-243, 1953.

SMITH,G.W. Fumonisins. In: GUPTA,R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, 2007, p. 983-998.

SMITH,T.K.; DIAZ,G.; SWAMY,H.V. Current Concepts in Mycotoxicosis in Swine. In: DIAZ,D. **The Mycotoxin Blue Book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005, p.235-248.

SURAI,P.F.; DVORSKA,J.E. Effects of Mycotoxins on Antioxidant Status and Immunity. In: DIAZ,D. **The Mycotoxin Blue Book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005, p.93-137.

SZCZECH, G.M.; CARLTON,W.W.; TUITE,J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. **Veterinary Pathology**, v.10, p.135-154, 1973a.

SZCZECH, G.M.; CARLTON,W.W.; TUITE,J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v.10, p.219-231, 1973b.

SZCZECH, G.M.; CARLTON,W.W.; HINSMAN,E.J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. III. Terminal renal ultrastructural alterations. **Veterinary Pathology**, v.11, p.385-406, 1974.

WITHANAGE,G.S.; MURATA,H.; KOYAMA,T.; ISHIWATA,I. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. **Veterinary and Human Toxicology**, v.43, p.6-10, 2001.

FIGURAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS MICOTOXINAS DE POTENCIAL TOXICOLÓGICO, RESPECTIVOS FUNGOS PRODUTORES E ÓRGÃOS-ALVO

Micotoxina	**Principais Fungos Produtores**	**Órgãos-alvo**
Aflatoxina	*Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nominus* e *Penicilium puberulum*	Fígado
Deoxinivalenol	*Fusarium spp.*	Aparelho Digestório
Ocratoxina A	*P. verrucosum* e *A. ochraceus*	Rins
Zearalenona	*F. graminearum*	Aparelho Reprodutor
Citrinina	*P. citrinum, A. ochraceus* e *P. verrucosum*	Rins, Aparelho Digestório
Penitren A	*P. crustosum*	Sistema Nervoso Central
Roquefortina	*P. roqueforti*	Sistema Nervoso Central
Fumonisina	*Fusarium verticillioides*	Fígado

3 CAPÍTULO 1 - AFLATOXICOSE EXPERIMENTAL EM CÃES RETRIEVER DO LABRADOR *(Experimental aflatoxicosis in Labrador Retriever dogs)*

PATRICIA MUZOLON, FABIANO MONTIANI-FERREIRA, MARCONI DE FARIAS, ELIZABETH SANTIN, LARISSA ANUSKA ZENI CONDAS

3.1 - RESUMO

A aflatoxicose é uma doença que ocorre após a ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos em grãos. As aflatoxinas são hepatotóxicas, imunodepressoras, carcinogênicas e anticoagulantes. Esse estudo teve como objetivo avaliar como os cães poderiam ser afetados após exposição a níveis subletais de aflatoxina na dieta, e ainda, verificar as alterações mais precoces que poderiam servir como marcadores de aflatoxicose. O experimento foi conduzido com 16 cães da raça Retriever do Labrador, de 4 a 5 meses de idade, peso e gênero igualmente distribuídos. Os cães foram divididos em dois grupos de 8 cães cada. Um grupo destes cães foi exposto, diariamente, por 3 meses a 100 µg/Kg de aflatoxina junto com a ração. O outro grupo foi controle e recebeu a mesma ração sem aflatoxina. A pesquisa de micotoxinas nas amostras de ração revelou a presença incidental de aflatoxina, zearalenona e fumonisina já existentes, que muito provavelmente agiram de forma sinérgica agravando a intoxicação dos cães. A análise da ração do grupo aflatoxina revelou média de 78,6 µg/Kg no momento do consumo. As alterações significativas após 3 meses de intoxicação foram: presença intermitente depressão, anorexia e diarréia, elevação da ALT, AST, fosfatase alcalina e bilirrubinas direta, indireta e total, redução da proteína total, globulina e proteína plasmática. Além disso, observou-se hiperecogenicidade ao exame ultra-sonográfico do fígado. O exame histopatológico de amostras hepáticas colhidas por biópsia revelou necrose, transformação gordurosa e fibrose. As alterações dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada foram precocemente observadas, sendo que já demonstraram elevações após o primeiro mês de intoxicação.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxina, cães, fígado, intoxicação experimental, toxicidade.

3.2 - ABSTRACT

Aflatoxicosis is a disease that occurs after ingestion of toxic metabolites produced by fungi on grains. The aflatoxins are hepatotoxic, immunosupressors, carcinogenic and anticoagulants. The objective of this study was to characterize the intoxication in dogs after exposure to sublethal levels of aflatoxin in the diet, and also check early changes that could serve as markers of aflatoxicosis. The experiment was conducted with 16 Labrador Retriever dogs, 4 to 5 months old, weight and gender equally distributed. The dogs were split into two groups of 8 dogs each. A group of dogs was exposed for 3 months to 100 µg/Kg of aflatoxin along with the food. The other was the control group and received the same food without aflatoxin. The research of mycotoxins in samples of dog food showed the presence of aflatoxin, zearalenone and fumonisin, which probably acted on a synergistic effect aggravating the intoxication of dogs. The food analysis of aflatoxin in the dog food of the experimental group showed an average of 78.6 µg/Kg instead of 100 µg/Kg. The significant changes after 3 months of intoxication were: intermittent presence of depression, anorexia and diarrhea, elevation of ALT, AST, alkaline phosphatase, direct, indirect and total bilirubin, reduced total protein, globulin and plasma protein. Moreover, hyperechogenicity of the hepatic parenchyma. was observed on the ultrasonographic examination. Histopathological examination revealed necrosis, fibrosis and fatty degeneration of liver samples collected via percutaneous biopsy. The changes of prothrombin time and partial thromboplastin time were observed early, elevations were demonstrated since the first month of intoxication.
KEYWORDS: aflatoxin, dogs, experimental intoxication, liver, toxicity.

3.3 - INTRODUÇÃO

A aflatoxicose é uma doença que ocorre em conseqüência da ingestão de metabólitos altamente tóxicos produzidos por fungos, principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nominus* e *Penicilium puberulum*. Esses fungos crescem em uma grande variedade de grãos, como milho, amendoim, soja, arroz, sorgo e semente de algodão, presentes em regiões tropicais e subtropicais (RUMBEIHA, 2000).

O crescimento fúngico e a conseqüente produção de aflatoxina são favorecidos por condições ideais de temperatura, entre 12º a 40º C, pH, entre 3,5 a 8,0, atividade água, próxima a 0,99. Outros fatores que favorecem seu crescimento ainda incluem eventuais episódios estressantes sofridos pela planta que dará origem aos grãos (como ataque de pragas) e da redução do vigor da mesma (SANTIN, 2005).

Muitas empresas de ração para cães, independentemente da qualidade de seus produtos, utilizam grãos na formulação. Todavia, algumas marcas de ração regularmente usam grãos de baixa qualidade. Há uma forte possibilidade de que cães que consomem essas rações estejam, de fato, sendo expostos cronicamente a baixos níveis de aflatoxinas, pois se sabe que até 25% da produção mundial de grãos possa estar contaminada por micotoxinas (FINKS-GREMMELS, 1999).

As aflatoxinas podem causar uma intoxicação, na maioria dos casos, do tipo subaguda a crônica, e acometem animais de produção, animais de companhia e seres humanos no mundo todo. Tais padrões de intoxicação tornam difícil o diagnóstico precoce, sendo sua prevalência subestimada por médicos e médicos veterinários. A gravidade da doença varia de acordo com a espécie, idade, estado hormonal (estro ou gestação), estado nutricional, quantidade de toxina ingerida e tempo de ingestão (SCHULTZ, 1988).

A primeira descrição de aflatoxicose em cães foi em 1952 nos Estados Unidos, quando uma ração contaminada por fungos ocasionou a “hepatite X”, de etiologia desconhecida na época (SEIBOLD & BAILEY, 1952; SEIBOLD, 1953). A descoberta das aflatoxinas (ASAO et al., 1963) permitiu a correlação com a “hepatite X” e assim desvendou a sua causa (NEWBERNE et al.,1966).

Nos animais de estimação (cães, gatos, aves, peixes), o fígado é o principal órgão alvo. As aflatoxinas também são imunodepressoras, nefrotóxicas, carcinogênicas e possuem efeito anticoagulante. Os cães e os gatos são extremamente sensíveis. A DL50 da aflatoxina B1 nos cães é 0,5-1,0 mg/kg e nos gatos é 0,3-0,6 mg/kg (PATTERSON, 1977). No Brasil as aflatoxicoses e outras micotoxicoses ainda são doenças pouco e/ou mal diagnosticados em pequenos animais.

As aflatoxinas são potentes inibidores da mitose, pois se ligam ao DNA do cromossomo e impedem a atividade de transcrição da RNA polimerase. Em outras palavras a ligação das aflatoxinas às moléculas de DNA impede a produção de novos RNA a partir do molde de DNA no cromossomo dos hepatócitos, evitando subseqüente replicação celular (MOISAN, 2006).

A aflatoxicose clínica em cães pode ser diferenciada como aguda, subaguda, ou crônica. A aflatoxicose aguda ocorre quando cães ingerem quantidades acima de 1,0 mg/kg de aflatoxina B_1, a subaguda ocorre após ingestão de concentrações entre 0,5 e 1,0 mg/kg de aflatoxina B_1 e a forma crônica é causada pela ingestão, continuada ou intermitentemente, de pequenas a moderadas quantidades de aflatoxinas, entre 0,5 e 30 µg/kg aflatoxina B_1 (NEWBERNE et al., 1966).

Os sinais clínicos variam muito e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento, mas a mortalidade é quase sempre baixa (PATTERSON, 1977).

Na histopatologia de casos agudos há presença de grave transformação gordurosa com nítida vacuolização dos hepatócitos, hiperplasia dos ductos biliares e congestão das veias portal e central (RUMBEIHA, 2000). Em casos subagudos há transformação gordurosa, hiperplasia dos ductos biliares, início de regeneração hepática e fibroplasia portal. Nos casos crônicos há extensa fibrose hepática e hiperplasia dos ductos biliares, fibrose portal com formação de pontes fibróticas e nódulos de regeneração (NEWMAN et al., 2007).

A exposição às aflatoxinas tem o potencial de determinar o desenvolvimento de neoplasia hepática nos animais de estimação que se

recuperaram dos efeitos da exposição aguda, subaguda ou crônica (RUMBEIHA, 2000). As alterações da coagulação estão relacionadas à estrutura química e farmacodinâmica das aflatoxinas, que se comportam como cumarínicos, exercendo um efeito anticoagulante (BABABUNMI et al., 1997).

O diagnóstico pode ser feito pela análise do alimento suspeito, com identificação e quantificação das micotoxinas. Os métodos são seguros, mas correspondem somente à amostra analisada e não necessariamente consumida. A amostragem do alimento é complicada, pois a distribuição das micotoxinas pode ser muito heterogênea, já que elas podem concentrar-se em uma área ou ponto específico da ração armazenada (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

Os métodos mais utilizados são ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e os métodos químicos cromatografia em camada delgada (*Thin-layer Chromatography* - TLC), cromatografia líquida de alta resolução (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC) e também cromatografia gasosa (FIREMAN, 2007). Os achados de necropsia e a caracterização histopatológica poderão apenas sugerir a doença.

O objetivo deste estudo foi determinar quais as manifestações bioquímicas e estruturais decorridas da intoxicação experimental pela aflatoxina veiculada pelo alimento contaminado. Além disso, analisar pelos dados obtidos, quais dessas alterações poderiam ser potencialmente utilizadas no futuro como marcadores da intoxicação com dose subletal de aflatoxina em cães, possibilitando assim um diagnóstico precoce e evitando complicações mais graves da doença.

3.4 - MATERIAL E MÉTODO

O modelo experimental foi desenhado utilizando cães da raça Retriever do Labrador, de 4 a 5 meses de idade, peso e gênero igualmente distribuídos em 2 grupos. Estes cães foram mantidos em condições ambientais, de alimentação e de higiene controladas, em um canil experimental localizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR - Campus São José dos Pinhais, Paraná.

O projeto foi analisado e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC-PR de acordo com as normas vigentes nessa universidade.

Os animais foram divididos em dois grupos de 8 cães cada: 1) Um grupo foi exposto, cronicamente por 3 meses, a níveis subletais de aflatoxina purificada em sua alimentação (100 µg/Kg); 2) O grupo controle recebeu o mesmo preparado alimentar sem a adição de aflatoxina.

A composição básica da ração era leite integral em pó, farinha de carne, farinha de peixe, farinha de vísceras de frango, milho integral, farelo de gérmen de milho, quirera de arroz, farelo de glúten de milho, farelo de soja, farelo de trigo, açúcar, óleo de milho, carbonato de cálcio, suplemento vitamínico e mineral, cloreto de sódio. Os níveis de garantia fornecidos pelo fabricante podem ser verificados na TABELA 2.

A ração disponibilizada para o experimento foi gentilmente doada por uma fábrica de ração para carnívoros e apresentava-se extrusada e peletizada, sem o banho final de óleo de frango e palatabilizante (essa etapa final foi excluída na fábrica para que o preparo semanal da ração com aflatoxina utilizasse os óleos como veículo para adicionar a aflatoxina em pó e assim determinar com precisão a contaminação da ração). A quantidade de óleos adicionada foi correspondente a 4% do peso final da ração. O preparo da ração controle iniciava com a colocação da ração crua em misturador de cone duplo de tombamento e adição do óleo de frango e palatabilizante. Já o preparo da ração com aflatoxina era diferenciado apenas pela adição do pó de aflatoxina purificada ao óleo de frango e ao palatabilizante, em quantidade correspondente a 100 µg/Kg. A mistura da aflatoxina em pó ao óleo era feita no liquidificador industrial por 10 minutos para assimilação e homogeneização. Para ambos os tipos de ração o misturador era ligado por 15 minutos para agitar a ração e assimilar os óleos. A ração era em seguida armazenada em sacos de ráfia (sacos duplos no caso da ração com aflatoxina) e estava pronta para o consumo. Amostras dos dois tipos de ração eram colhidas logo após o preparo e quase ao término de seu consumo pelos cães, para análise de micotoxinas pelo método ELISA.

Foram adotados procedimentos de segurança para manipulação da aflatoxina purificada por todos os funcionários que mantinham contato com a substância, como uso de máscara de carvão ativado, óculos de proteção, luvas de borracha e avental. A aflatoxina em pó era mantida em frasco opaco para proteção contra luminosidade, aberto somente para pesagem da quantidade necessária no preparo semanal. O volume usado semanalmente era acondicionado em pequenos frascos também protegidos contra luminosidade.

A análise micotoxicológica foi feita empregando o método ELISA, por meio de kits específicos para cada micotoxina a ser pesquisada. As amostras de ração eram moídas e a fração de 10 g era acondicionada em frasco para posterior extração com Metanol 70%, na proporção de 1 : 5. O kit de Análise de Aflatoxina Total AgraQuant® tem uma faixa de quantificação 4–40 µg/Kg, o Kit de Análise AgraQuant® Fumonisina Total tem uma faixa de quantificação de 0.25 – 5.0 mg/Kg e o Kit de Análise AgraQuant® Zearalenona tem uma faixa de quantificação de 40-1000 µg/Kg. Cada kit vem completo com padrões de Aflatoxina, Fumonisina ou Zearalenona, cada um com 96 micropoços revestidos de anticorpos, 96 micropoços coloridos de diluição, conjugado, substrato e solução stop. Os resultados foram obtidos no leitor de placas ELISA ELX-800 da Lionheart Diagnostics®.

Para padronização da leitura e comparação com os dados obtidos posteriormente, exame físico geral, ultra-sonografia abdominal, coleta de sangue e urina, assim como biópsia hepática percutânea utilizando-se agulha do tipo Menghini e exame histopatológico dos fragmentos foram realizados antes do início do experimento. Após o início do experimento, os mesmos procedimentos foram realizados aos 30, 60 e 90 dias em cada grupo de cães.

As amostras sangüíneas para análise bioquímica do soro foram de 10 mL, e para análise de bilirrubinas no soro foram de 3 mL, colhidas por venopunção jugular e acondicionadas em tubos de centrífuga, protegidos da luz no caso das bilirrubinas, para seguinte obtenção de soro após centrifugação a 2500 rotações por minuto, durante 5 minutos. A análise bioquímica do soro para quantificação de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase

alcalina, gama-glutamil transferase (GGT), bilirrubina direta e total, creatinina, lipase, uréia sangüínea, proteína total e frações (albumina e globulina), foi feita foram realizadas por meio de método colorimétrico em fotômetro semi-automático para bioquímica Quick Lab II® da marca Drake®, utilizando kits comerciais da Lab Test® específicos para cada componente a ser analisado. Os resultados foram obtidos de acordo com a leitura da absorbância correspondente a cada exame, à temperatura de 37°C.

As amostras sangüíneas para o hemograma foram de 3 mL, colhidas por venopunção jugular e acondicionadas em tubos de centrífuga com EDTA (Ácido Etilendinitrilo Tetraacético) como anticoagulante, para seguinte utilização do sangue total. Foram realizadas contagens manuais do total de hemácias, plaquetas e leucócitos, feitas em câmara de Neubauer, após diluição prévia do sangue. Para a contagem de eritrócitos a diluição empregada foi 20 μL de sangue total em 4 μL de líquido de Hayem. Para a contagem de leucócitos a diluição foi de 20 μL de sangue total em 400 μL de líquido de Turckey. O esfregaço sangüíneo é feito para realizar a diferenciação entre leucócitos, determinando o número de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Usado também para avaliar a série vermelha e realizar a contagem de plaquetas. A técnica do esfregaço baseia-se em arrastar uma gota de sangue sobre a superfície da lâmina de vidro, com a borda de outra lâmina, para formação de uma película. A lâmina foi corada com Panótico e observada em microscópio com objetiva de aumento de 100X.

As amostras sangüíneas para a realização dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada foram de 3 mL, colhidas por venopunção jugular e acondicionadas em tubos de centrífuga contendo solução de Citrato de Sódio Tamponado a 3,2% como anticoagulante, para seguinte utilização. A amostra de sangue é centrifugada para obtenção do plasma sanguíneo citratado. Para determinação do tempo de protrombina (TP), foram pipetados 50 μL do plasma em tubos pré-aquecidos e incubados a 37°C por 3 minutos. Após, adicionaram-se 100μL do respectivo reagente pré-aquecido a 37°C, revertendo o efeito do citrato e permitindo que ocorra a coagulação. Para determinação do tempo de

tromboplastina parcial ativada (TTPa), foram pipetados 50µL do plasma e 50 µL do respectivo reagente (com ativador elágico) em tubos pré-aquecidos e incubados a 37°C por 1 minuto. Após, foi adicionado 50 µL de cloreto de cálcio pré-aquecido a 37°C e incubado por 3 minutos. A medição baseia-se no tempo de coagulação de um plasma sanguíneo recalcificado. O tempo que as amostras levam para coagular é medido opticamente. Os reagentes foram da marca Wiener Lab® usados no coagulômetro Quick Timer II® da Drake®.

Os fragmentos de fígado colhidos por meio de biópsia foram fixados por 48 horas em formol tamponado 10%, desidratados por imersão em uma série crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes de 5 mm foram obtidos e subseqüentemente corados com hematoxilina-eosina. As lâminas e lamínulas de vidro com os cortes foram então montadas e a análise histológica foi feita em microscópio óptico com objetivas de 10, 20, 40 e 100 vezes.

Hemograma e análise bioquímica do soro, incluindo avaliação da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, creatinina, uréia sangüínea, proteína total e frações, gama-glutamil transferase (GGT), bilirrubinas, lipase, tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa) além de urinálise, foram feitos em todas as datas mencionadas. As amostras do fígado foram enviadas para exame histopatológico para pesquisa de sinais típicos de exposição às aflatoxinas como necrose hepática centrolobular e hiperplasia dos ductos biliares.

Houve o óbito de um dos animais do grupo aflatoxina onze dias antes do último procedimento de colheita de amostras. Os resultados e achados de necropsia serão discutidos em um capítulo à parte.

A análise estatística das medições clínicas foi realizada empregando o teste-*t* ou análise de variância (ANOVA). Os testes foram todos realizados por um *software* de análises estatísticas (JMP; SAS Institute Inc., Cary, NC). Se alguma significância estatística foi encontrada os valores de *P* foram corrigidos posteriormente, usando um dos testes de *post-hoc* (testes de Fisher ou Tukey-Kramer). Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Para melhor compreender e analisar os resultados entre os grupos e entre as de

amostra foram feitas comparações entre grupos para as diferentes colheitas, e entre colheitas para os diferentes grupos.

3.5 - RESULTADOS

A pesquisa de micotoxinas nas amostras de ração, pelo método ELISA, revelou a presença de outras micotoxinas já existentes, originadas naturalmente nos subprodutos e/ou na ração vinda da fábrica. As micotoxinas pesquisadas e encontradas foram aflatoxina, zearalenona e fumonisina, tanto no alimento preparado para o grupo controle quanto para o grupo aflatoxina (TABELA 3). Os resultados obtidos para a análise de aflatoxina variaram de 71 a 108 µg/Kg, com média de 78,6 ± 7,5 EPM, mesmo que os cálculos tenham sido feitos para uma dose de 100 µg/Kg.

Os cães, após três meses de exposição à aproximadamente 78,6 µg/Kg de aflatoxina, demonstraram elevação na atividade da ALT (GRÁFICO 1), AST, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, bilirrubina total (GRÁFICO 2), fosfatase alcalina e redução da proteína total, globulina, proteína plasmática, lipase e uréia (TABELA 4). Não houve alterações significativas na atividade da albumina, creatinina e GGT. A atividade da GGT após três meses apresentou uma tendência à elevação, mas que não foi significativa devido à elevada variação individual observada (TABELA 5).

O tempo de protrombina revelou elevação gradativa desde o dia 30. Nos Dias 30, 60 e 90 o grupo aflatoxina teve suas médias acima do intervalo de referência (5,47 – 8,27 segundos – 6,87 ± 1,4 EPM) (LOPES et al., 2005) (GRÁFICO 3). O tempo de tromboplastina parcial ativada revelou elevação gradativa desde o dia 30. Todas as mensurações apresentaram valores dentro do intervalo de referência (13,5 – 16,7 segundos – 15,1 ± 1,6 EPM) (LOPES et al., 2005) (GRÁFICO 4).

No hemograma, o eritrograma não demonstrou alterações significativas, já o leucograma demonstrou uma tendência de redução ($p > 0,05$) nas contagens de leucócitos totais, linfócitos, monócitos, neutrófilos e segmentados (TABELA 5). Não houve alteração significativa na contagem de bastonetes, eosinófilos e

plaquetas, nem na mensuração de fibrinogênio. Na urinálise houve elevação significativa na mensuração de pH (TABELA 4), mas não houve alteração significativa na mensuração da densidade urinária.

Na histopatologia houve transformação gordurosa leve a moderada, infiltrados inflamatórios (neutrófilos), fibrose periportal e necrose de hepatócitos isolados (FIGURA 1). A transformação gordurosa foi encontrada em diferentes graus em ambos os grupos ao longo dos três meses. Uma média de 51,25% das amostras do grupo aflatoxina apresentou transformação gordurosa.

A presença de infiltrados inflamatórios do tipo monomorfonuclear (neutrófilos e linfócitos) principalmente em localização periportal demonstrou uma média de 45% das amostras do grupo aflatoxina contra completa ausência dessas células no grupo controle. Ao final de três meses de intoxicação o grupo aflatoxina apresentou 80% de amostras contendo infiltrados inflamatórios em localização periportal, contra ausência de inflamação no grupo controle.

A fibrose periportal esteve presente em 40% das amostras do grupo aflatoxina ao final de três meses em comparação com total ausência de fibrose no grupo controle. Houve ainda formação de pontes fibróticas que ligavam espaço porta à veia centrolobular.

Um início de colestase esteve presente em 25% das amostras do grupo aflatoxina no dia 60. Aos 90 dias 60% das amostras desse grupo apresentaram colestase em grau leve. Houve ausência total de colestase em qualquer grau no grupo controle. Os achados histopatológicos de colestase corroboram os achados de aumento de bilirrubina indireta, devido aos hepatócitos lesionados, ou bilirrubina direta, devido à obstrução do sistema biliar intra-hepático, na avaliação bioquímica.

Ao final de três meses o cão 9 apresentou necrose periportal dos hepatócitos, além transformação gordurosa, infiltrados inflamatórios em espaço porta, fibrose periportal com formação de pontes fibróticas, hiperplasia de ductos biliares e colestase leve.

Na ultra-sonografia observou-se principalmente hiperecogenicidade hepática comparativamente ao córtex do rim direito ao final de três meses de

intoxicação (FIGURA 2). No dia 90 o grupo aflatoxina apresentou 62,5 % dos cães com hiperecogenicidade hepática, duas vezes e meia a mais de cães com hiperecogenicidade hepática dos cães do grupo controle (25%). Após três meses de intoxicação o cão 14 além da hiperecogenicidade apresentou um leve aumento hepático. Os cães intoxicados ainda apresentaram alterações na vesícula biliar, o cão 11 com sedimento ecogênico e o cão 13 com edema de parede.

O exame físico não demonstrou alterações significativas na mensuração do peso ou aferição da temperatura.

3.6 - DISCUSSÃO

A principal toxina associada com aflatoxicose é a aflatoxina B_1 e sua maior conseqüência é a hepatotoxicidade. A toxicidade só pode ser verificada no alimento suspeito após a verificação da sua presença e da sua potência tóxica por método analítico (KETTERER et al.,1975).

A variação das taxas de metabolismo entre diferentes espécies, idades, estado nutricional e níveis hormonais prejudica o acesso a animais expostos (GREENE et al., 1977). A susceptibilidade individual também pode ser afetada por níveis de hormônios sexuais, idade, dose e/ou grau de recusa alimentar (STENSKE et al., 2006).

A aflatoxina tem uma dose letal para 50% da população de cães (DL 50) entre 500 e 1000 µg/Kg, mas doses acima de 60 µg/Kg já podem ser tóxicas. O órgão americano que regulamenta alimentos e drogas (*Food and Drug Administration* – FDA) sugere completa ausência de aflatoxina nos alimentos, mas determina legalmente um limite máximo de 20 µg/Kg (ARMBRECHT et al.,1971; HAYES & WILLIAMS, 1978; HIDE et al., 1977; AGAG, 2004).

A aflatoxicose aguda ocorre quando cães ingerem quantidades acima de 1,0 mg/kg de aflatoxina B_1, a subaguda ocorre após ingestão de concentrações entre 0,5 e 1,0 mg/kg de aflatoxina B_1 e a forma crônica é causada pela ingestão, continuada ou intermitentemente, de pequenas a moderadas quantidades de aflatoxinas, entre 0,5 e 30 µg/kg aflatoxina B_1 (NEWBERNE et al., 1966).

A dose de aflatoxina purificada escolhida para o experimento foi de 100 µg/Kg para a intoxicação experimental por três meses. Essa quantidade encontra-se na faixa entre 50 – 300 µg/Kg, baixa à moderada quantidade de aflatoxina, responsáveis por causar aflatoxicose crônica após 6 – 8 semanas de ingestão contínua ou intermitente (RUMBEIHA, 2000).

Os resultados obtidos para a análise de aflatoxina variaram de 71 a 108 µg/Kg, com média de 78,6 ± 7,5. A diferença entre a dose calculada e a dose encontrada na análise de aflatoxina pode ser devido a perdas durante o preparo da ração, superestimação da concentração da fonte de aflatoxina purificada que assim alterou os cálculos, erro devido à amostragem ou mesmo erro na quantificação de aflatoxina pelo teste ELISA.

A presença de outras micotoxinas (fumonisina e zearalenona) na ração provavelmente agiu como um fator agravante na situação clínica e na fisiopatologia da intoxicação dos cães devido ao efeito sinérgico existente entre as micotoxinas. O limite máximo considerado seguro pode ser alterado pela presença de outras micotoxinas (COPPOCK & CHRISTIAN, 2007).

Ainda não existem estudos sobre a intoxicação de cães por fumonisina, nem de seus efeitos junto da presença de aflatoxina, mas DILKIN et al. (2003) demonstrou em suínos que a combinação de aflatoxina B_1 e de fumonisina B_1 reduziu a conversão alimentar e o consumo de ração e que a interação foi aditiva em relação aos parâmetros imunológicos e hepatotóxicos. Também não existem relatos do sinergismo entre aflatoxina e zearalenona, nem de fumonisina e zearalenona em cães, mas acredita-se que sejam interações aditivas já que possuem mecanismo de ação diferentes.

As alterações clínicas observadas nos cães intoxicados com aflatoxina foram inespecíficas e manifestaram-se nas últimas duas semanas do experimento. Houve presença de depressão, anorexia e diarréia, todos de forma intermitente. Não houve alterações significativas no peso e na temperatura quando comparados ao grupo controle. Os sinais clássicos de aflatoxicose semelhante ao estudo são: anorexia, depressão, poliúria, polidipsia, icterícia, vômito, diarréia, melena, diátese hemorrágica e pode ocorrer morte após choque intravascular disseminado

(GREENE et al., 1977; PATTERSON, 1977; LIGGETT et al., 1986 e NEWMAN et al., 2007). Vale salientar que no estudo de SHIH et al. (2007) observou-se que os cães Retriever do Labrador têm predisposição à doença hepática crônica, em comparação com outras raças, e muitos desses cães apresentaram elevação das enzimas hepáticas, mas nenhum sinal clínico. Por este motivo talvez os cães da raça Retriever do Labrador sejam ainda mais sensíveis aos danos hepáticos e hemodinâmicos causados pelas micotoxinas, particularmente pela aflatoxina.

Os sinais clínicos inespecíficos não são suficientes para o diagnóstico, mas a combinação deles pode sugerir aflatoxicose, que deve ser incluída na lista de diagnóstico diferencial dos cães com sinais de doenças gastrintestinais, particularmente os hepatopatas, que são levados à clínica.

A elevação da ALT e da AST após perdas por extravasamento do citoplasma sugeriu danos nos hepatócitos pela necrose e pelo edema hepatocelular e corroboram os achados de NEWMAN et al. (2007) e COPPOCK & CHRISTIAN (2007). A elevação de todas as bilirrubinas foi devido ao edema dos hepatócitos, colestase, e fibrose periportal com hiperplasia dos ductos biliares e corrobora os achados de NEWMAN et al. (2007). A elevação da fosfatase alcalina devido a colestase biliar corrobora os achados de CHAFFEE et al. (1969) e NEWMAN et al. (2007). A elevação dos níveis de ALT, AST, bilirrubinas e fosfatase alcalina foi um reflexo do estabelecimento de doença hepática no grupo que recebeu aflatoxina por três meses. As reduções da proteína total sérica (soro proveniente de colheita de sangue total e ocorrência de coagulação natural com gasto de fibrinogênio, fibrina e fatores de coagulação participantes da coagulação) e da proteína plasmática (proveniente do plasma obtido após colheita de sangue em frasco com EDTA) demonstraram a inibição da síntese protéica decorrentes dos danos hepáticos causados pela aflatoxina, achados que corroboram DENNING (1987) e NEWMAN et al. (2007).

Pode-se concluir que as principais conseqüências da intoxicação por aflatoxina quanto aos parâmetros bioquímicos, após três meses de intoxicação, foram relacionados ao aumento da atividade de enzimas hepáticas pelo extravasamento hepatocelular, às conseqüências da perda da estrutura hepática

funcional, ao aprisionamento de bile e suas conseqüências tóxicas para o fígado e à significativa redução da síntese protéica.

As lesões histopatológicas observadas neste estudo são semelhantes às previamente descritas para aflatoxicose em cães. BASTIANELLO et al. (1987) classificaram a doença, pelo exame histopatológico, como aguda, subaguda e crônica. A forma subaguda é caracterizada por hiperplasia de ductos biliares, variados graus de fibrose, perda da arquitetura normal dos cordões de hepatócitos, extensa transformação gordurosa, formação de pontes fibróticas e presença de discreta lobulação, esta que em cães saudáveis apresenta-se indistinta. No dia 90 os cães intoxicados apresentaram transformação gordurosa (80%), fibrose hepática periportal (40%), colestase (60%) e necrose de hepatócitos isolados (20%), achados estes corroborados pelos trabalhos de NEWBERNE & BUTLER (1969); EDDS (1973); BASTIANELLO et al. (1987); CENTER (1996) e NEWMAN et al. (2007). Houve também a presença de infiltrados inflamatórios em 80% dos cães, o que corrobora os achados de infiltrados linfocitários em localização periportal de CENTER (1996) e NEWMAN et al. (2007).

Segundo a descrição de BASTIANELLO et al. (1987) a doença dos cães intoxicados nesse estudo foi classificada histopatologicamente como aflatoxicose do tipo subaguda. BASTIANELLO et al. (1987) descreveu a forma aguda pela presença de transformação gordurosa, distinta vacuolação dos hepatócitos, canalículos biliares preenchidos com bile e congestão das veias portal e central, e a forma crônica pela presença de extensa fibrose hepática, hiperplasia dos ductos biliares e nódulos de regeneração hepatocelular.

Adicionalmente, as observações de tendências não significativas demonstradas pelos animais que receberam aflatoxina por três meses poderiam ser explicadas das seguintes formas: 1) Tendência de elevação da atividade da GGT - demonstrando uma possível colestase biliar, uma das principais alterações encontradas em casos de aflatoxicose segundo COPPOCK & CHRISTIAN (2007), e 2) Tendência de redução nas contagens de leucócitos totais, linfócitos,

monócitos, neutrófilos e segmentados - possível conseqüência da imunossupressão causada pelo consumo de aflatoxina.

A elevação do tempo de protrombina, de forma gradativa e desde os 30 dias de intoxicação, demonstrou alteração na via de coagulação comum (fatores V, X, protrombina e fibrinogênio), sendo um possível efeito anticoagulante da aflatoxina e/ou deficiência de vitamina K_1. A alteração na coagulação pode ser explicada em parte pela composição química da aflatoxina ser do tipo cumarínica e atua como anticoagulante (GREENE et al., 1977). A deficiência de vitamina K1 pode ser decorrente de uma doença hepática (CENTER, 1996). A elevação do tempo de tromboplastina parcial ativada também de forma gradativa e desde 30 dias de intoxicação demonstrou alteração na via de coagulação intrínseca (fatores VIII, IX, XI, XII) e/ou na via de coagulação comum (fatores V, X, protrombina e fibrinogênio). O aumento significativo nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada corrobora os achados de GREENE et al. (1977); COPPOCK & CHRISTIAN (2007) e NEWMAN et al. (2007). Essas alterações revelam claramente que na vigência de lesão hepática, a coagulação destes cães mostrou-se severamente e precocemente comprometida.

Na urinálise, a elevação do pH ocorreu em conseqüência a uma possível infecção urinária subclínica provavelmente causada por imunossupressão vigente, pois havia grande quantidade de bactérias na urina dos cães intoxicados.

Na ultra-sonografia a hiperecogenicidade hepática, em relação ao córtex do rim direito, aparece em decorrência da fibrose hepática, sendo mais evidente após três meses do início da intoxicação.

3.7 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos revelaram que a primeira alteração significativa observada em cães intoxicados experimentalmente por aflatoxina é uma coagulopatia, particularmente no que tange alterações nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada. Sugere-se, portanto, particularmente por causa da precocidade do aparecimento destas alterações, a possibilidade de utilizar tais exames de coagulação como marcadores de aflatoxicose inicial e/ou subaguda.

As análises laboratoriais, ultra-sonográficas e clínicas mais clássicas para o diagnóstico de aflatoxicose demonstraram alterações significativas somente após três meses de intoxicação, o que dificulta sua aplicabilidade como ferramentas de diagnósticos nas fases mais iniciais da doença.

Pacientes com alterações do perfil bioquímico sérico tais como aumento de AST, bilirrubina total, direta e indireta, acompanhada de redução da proteína total, albumina e globulina devem ser considerados suspeitos de intoxicação por aflatoxina no momento da elaboração da lista de diagnósticos diferenciais pelo clínico de pequenos animais.

Não obstante, na histopatologia de fragmentos de tecido hepático, a presença das seguintes alterações: colestase, transformação gordurosa e presença de infiltrados inflamatórios do tipo monomorfonuclear (neutrófilos e linfócitos), acompanhada de hiperplasia de ductos biliares e fibrose em localização periportal também devem ser consideradas fortemente sugestivas de aflatoxicose, principalmente quando associado ao histórico, demais achados clínicos e ultra-sonográficos condizentes.

3.8 - REFERÊNCIAS

AGAG,B.I. Mycotoxins in foods and feeds 1 – Aflatoxins. **Assiut University Bulletin for Environmental Researches**, v.7, p. 173-205, 2004.

ARMBRECHT,B.H.; GELETA,J.N.; SHALKOP,W.T.; DURBIN,C.G. A subacute. exposure of beagle dogs to aflatoxin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.18, p.579-585, 1971.

ASAO,T.; BUCHI,G.; ABDEL-KADER,M.M.; CHANG,S.B.; WICK,E.L.; WOGAN,G.N. Aflatoxins B and G. **Journal of American Chemistry Society** , v.85, p.1706-1707, 1963.

BABABUNMI,E.A.; THABREW,I.; BASSIR,O. Aflatoxin induced coagulopathy in different nutritionally classified animal species. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.34, p.161-181, 1997.

BASTIANELLO,S.S.; NESBIT,J.W.; WILLIAMS,M.C.; LANGE,A.L. Pathologic findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 635-640, 1987.

CENTER,S.A. Acute Hepatic Injury: Hepatic Necrosis and Fulminant Hepatic Failure. In: In: STROMBECK,D.R.; CENTER,S.A; GUILFORD,W.G.; WILLIAMS,D.A.; MEYER,D.J. **Small Animal Gastroenterology.** 3.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996, p.654-704.

CHAFFEE,V.W.; EDDS,G.T.; HIMES,J.A.; NEAL,F.C. Aflatoxicosis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, p.1737–1749, 1969.

COPPOCK,R.W.; CHRISTIAN,R.G. Aflatoxins In: GUPTA,R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press (2007), p. 939-950.

DENNING,D.W. Aflatoxin and human disease. **Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Reviews**, v.4, p.175-209, 1987.

DILKINA,P.; ZORZETEA,P.; MALLMANN,C.A..; GOMES,J.D.F.; UTIYAMA,C.E.; OETTING,L.L.; CORREA,B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing Fusarium moniliforme culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.1345-1353, 2003.

EDDS, G.T. Acute aflatoxicosis: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.162, n.4, p.304-309, 1973.

FINKS-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. Veterinary Quarterly, v. 21, p. 115–120.

FIREMAN,A. Micotoxinas - A Importância do Gerenciamento, dos Métodos Diagnósticos Corretos e da Escolha do Produto Certo Para Evitar seus Efeitos Deletérios Sobre a Produção Animal. **Produção Animal – Avicultura**, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Report of the 32nd Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants**, Beijing – China, 2000. Available in: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/005/X7137e/ X7137e.pdf, Acesso em 15 nov. 2007.

GREENE,C.E.; BARSANTI,J.A.; JONES,B.D. Disseminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. **The Cornell Veterinarian**, v.67, p. 29-49,1977.

HAYES, A.W.; WILLIAMS,W.L. Acute toxicity of aflatoxin B1 and rubratoxin B in dogs. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v.1, p.59-70, 1978.

HYDE,W.; KIESEY,J.; ROSS,P.F.; STAHR,H.M. General GAS Chromatography. In: STAHR,H.M. **Analytical Methods in Toxicology**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1991, p.104-106.

JAIN,N.C. **Essentials of Veterinary Hematology.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932p.

KETTERER,P.J.; WILLIAMS,E.S.; BLANEY,B.J.; CONNOLE,M.D. Canine Aflatoxicosis. **Australian Veterinary Journal**,v.51, p.355-357,1975.

LIGGETT,A.D.; COLVIN,B.M.; BEAVER,R.W.; WILSON,D.M. Canine aflatoxicosis: a continuing problem. **Veterinary and Human Toxicology**, v.28, p.428-430, 1986.

LOPES,S.T.A; EMANUELLI,M.P.; SCHMIDT,C.; RAISER,A.G.; MAZZANTI,A.; ALVES,A.S. Valores de referência do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em cães. **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.381-384, 2005.

MOISAN,P. Canine Aflatoxicosis and Tainted Dog Food. **The North Carolina Veterinary Diagnostic Laboratories Report**, v.1, p.3-4, 2006.

NEWBERNE,P.M.; BUTLER,W.H. Acute and chronic effects of aflatoxina on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Research**, v.29, p. 236-250, 1969.

NEWBERNE,P.M., RUSSO,R., WOGAN,G.N. Acute toxicity of aflatoxin B1 in the dog. **Pathologia Veterinaria**, v.3, p.331-340, 1966.

NEWMAN,S.J.; SMITH,J.R.; STENSKE,K.A.; NEWMAN,L.B.; DUNLAP,J.R.; IMERMAN,P.M.; KIRK,C.A. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.168-175, 2007.

PATTERSON,D.S.P. Toxin-producing fungi and susceptible animal species. In: WYLLIE,T.D., MOREHOUSE,L.G. **Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Micotoxicosis Vol 1**. New York:Marcel Dekker Inc,1977, p. 156-158.

RUMBEIHA,W.K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

SANTIN,E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ,D. **The Mycotoxin Blue Book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005, p.225-234.

SCHULTZ,J. Micotoxicoses. In: BEER,J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** 1.ed. São Paulo: Editora Roca, 1988, p.365 – 372.

SEIBOLD,H.R. Hepatitis X in dogs. **Veterinary Medicine**, v.48, p.242-243, 1953.

SEIBOLD,H.R.; BAILEY,W.S. An epizootic of hepatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.121, p.201-206,1952.

SHIH,J.L.; KEATING,J.H.; FREEMAN,L.M.; WEBSTER,C.R.L. Chronic Hepatitis in Labrador Retrievers: Clinical presentation and Prognostic Factors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.33-39, 2007.

STENSKE,K.A.; SMITH,J.R.; NEWMAN,S.J.; NEWMAN,L.B.; KIRK,C.A. Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, p.1686-1691, 2006.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed.** 2000. Available in http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html, Acesso em 15 nov. 2007.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Final Guidance for Industry: Fumonisins Levels in Human Foods and Animal Feeds.** 2001. Available in http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html, Acesso em 15 nov. 2007.

FIGURAS

TABELA 2 – NÍVEIS DE GARANTIA DA RAÇÃO FORNECIDA AOS CÃES. DADOS FORNECIDOS PELO FABRICANTE.

ITEM	**QUANTIDADE**
UMIDADE	(máximo) 12,0%
PROTEÍNA BRUTA	(mínimo) 28,0%
EXTRATO ENTÉREO	(mínimo) 8,0%
MATÉRIA FIBROSA	(máximo) 5,0%
MATÉRIA MINERAL	(máximo) 9,0%
CÁLCIO	(máximo) 2,0%
FÓSFORO	(mínimo) 0,8%
ENERGIA METABOLIZÁVEL	(máximo) 2.990 kcal/kg

TABELA 3 – MÉDIAS DAS MICOTOXINAS ANALISADAS PELO MÉTODO ELISA, COM USO DE KITS AGRAQUANT® DA ROMERLABS® ESPECÍFICOS PARA CADA MICOTOXINA. REFERÊNCIAS: *(FDA, 2000); **(FAO, 2000); ***(FDA, 2001).

	AFLATOXINA (µg/Kg)	**ZEARALENONA** (µg/Kg)	**FUMONISINA** (mg/Kg)
SUBPRODUTOS[1]	3,3	9,7	4,9
RAÇÃO CONTROLE	3,5	7,8	4,7
RAÇÃO COM AFLATOXINA	78,6	6,9	5,4
NÍVEIS MÁXIMOS – RAÇÃO CÃES	20,0*	5,0**	5,0***

[1]CONJUNTO DOS INGREDIENTES LEVEDURA DE CERVEJA, FARELO DE TRIGO, FARELO DE SOJA, QUIRERA DE ARROZ, FARELO DE MILHO, FARELO DE TRIGO MOÍDO E SUB-PRODUTOS DE MILHO.

TABELA 4 – EFEITO DA INGESTÃO DE 78,6 µg/Kg DE AFLATOXINA AO FINAL DE 3 MESES QUANTO AOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E URINÁLISE (MÉDIA ± EPM-ERRO PADRÃO MÉDIO)

ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS			
ITEM	VALORES DE REFERÊNCIA	DIETA	
		CONTROLE	AFLATOXINA
ALT	(21 - 102 UI/L)*	99,118 ± 5,916	150,44 ± 5,828
AST	(23 - 66 UI/L)*	80,763 ± 6,830	105,3 ± 7,430
BILIRRUBINA DIRETA	(0,06 - 0,12 mg/dL)*	0,325 ± 0,071	0,770 ± 0,067
BILIRRUBINA INDIRETA	(0,01- 0,49 mg/dL)*	0,663 ± 0,093	1,060 ± 0,120
BILIRRUBINA TOTAL	(0,1 - 0,5 mg/dL)*	0,988 ± 0,159	1,824 ± 0,143
FOSFATASE ALCALINA	(20 - 156 UI/L)*	115,13 ± 6,962	171,8 ± 5,529
PROTEÍNA TOTAL	(5,4 - 7,1 g/dL)*	5,240 ± 0,085	4,657 ± 0,126
GLOBULINA	(2,3 - 5,2 g/dL)*	1,883 ± 0,074	1,543 ± 0,082
PROTEÍNA PLASMÁTICA	(5,8 - 7,8 g/dL)*	5,950 ± 0,098	5,314 ± 0,174
LIPASE	(104 - 1753 UI/L)*	217,55 ± 11,86	126,40 ± 27,28
URÉIA	(10 - 60 mg/dL)*	62,741 ± 1,858	36,151 ± 4,538
pH URINÁRIO	(5,5 - 7,0)*	6,071 ± 0,170	7,167 ± 0,307

*(REFERÊNCIA: KANEKO et al., 1997)

TABELA 5 - EFEITO DA INGESTÃO DE 78,6 µg/Kg DE AFLATOXINA AO FINAL DE 3 MESES QUANTO AOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CONTAGEM DO LEUCOGRAMA (MÉDIA ± EPM)

TENDÊNCIAS DE ALTERAÇÂO (NÃO SIGNIFICATIVAS)			
ITEM	VALORES DE REFERÊNCIA	DIETA	
		CONTROLE	AFLATOXINA
GGT	(1,2 – 6,4 UI/L)*	1,680 ± 0,38	3,254 ± 1,436
LEUCÓCITOS	(6000 – 17000 cels/ mm^3)**	16327 ± 767	14514 ± 1159
LINFÓCITOS	(1000 – 4800 cels/ mm^3)**	4580 ± 437	4238 ± 679
MONÓCITOS	(150 – 1250 cels/ mm^3)**	1206 ± 192	1004 ± 226
NEUTRÓFILOS	(3000 – 11800 cels/ mm^3)**	9893 ± 576	8851 ± 628
SEGMENTADOS	(3000 – 11500 cels/ mm^3)**	9893 ± 576	8801 ± 602

REFERÊNCIA: *(KANEKO et al., 1997); ** (JAIN, 1993).

GRÁFICO 1 – ALT - ELEVAÇÃO SIGNIFICATIVA DA ALT AO FINAL DE 3 MESES DE INTOXICAÇÃO (MÉDIA ± EPM) . A COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DEMONSTROU QUE NO DIA 90 A MÉDIA DO GRUPO CONTROLE FOI SIGNIFICATIVAMENTE INFERIOR À MÉDIA DO GRUPO AFLATOXINA. JÁ NA COMPARAÇÃO ENTRE DATAS, NOS DIAS 0, 30 E 60 AS MÉDIAS DO GRUPO AFLATOXINA FORAM SIGNIFICATIVAMENTE INFERIORES À SUA MÉDIA NO DIA 90, SUGERINDO O APARECIMENTO DE ALTERAÇÕES DE MODO MAIS TARDIO. REFERÊNCIA: 21 – 102 UI/L (KANEKO et al., 1997).

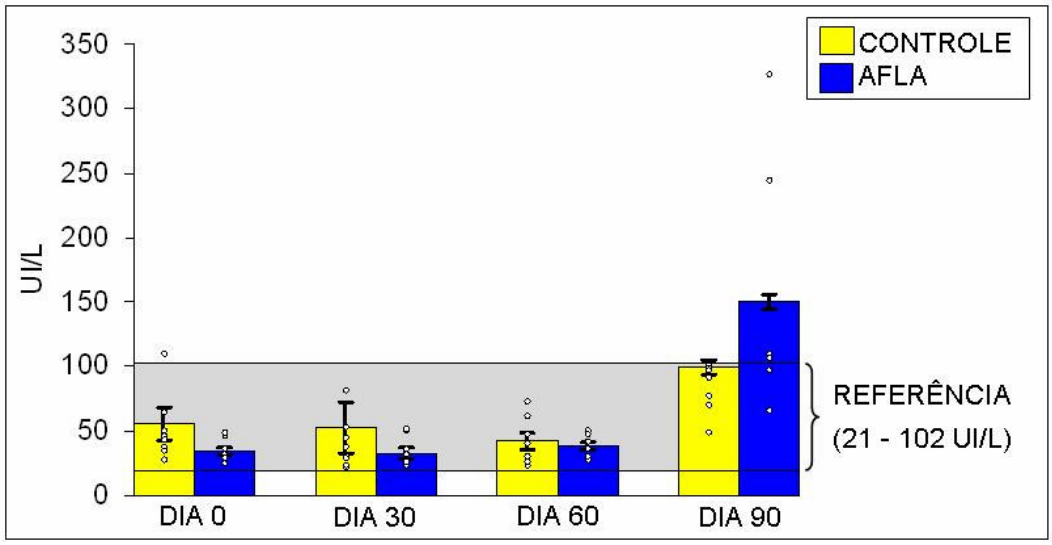


GRÁFICO 2 – BILIRRUBINA TOTAL - ELEVAÇÃO SIGNIFICATIVA DA BILIRRUBINA TOTAL AO FINAL DE 3 MESES DE INTOXICAÇÃO (MÉDIA ± EPM). A COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DEMONSTROU QUE NOS DIAS 30 E 90 AS MÉDIAS DO GRUPO CONTROLE FORAM SIGNIFICATIVAMENTE INFERIORES ÀS MÉDIAS DO GRUPO AFLATOXINA, JÁ NA COMPARAÇÃO ENTRE DATAS NO GRUPO AFLATOXINA, NOS DIAS 0, 30 E 60 AS MÉDIAS FORAM SIGNIFICATIVAMENTE INFERIORES À MÉDIA DO DIA 90, SUGERINDO O APARECIMENTO DE ALTERAÇÕES MAIS DE MODO TARDIO. REFERÊNCIA: 0,1 – 0,5 mg/dL (KANEKO et al., 1997).

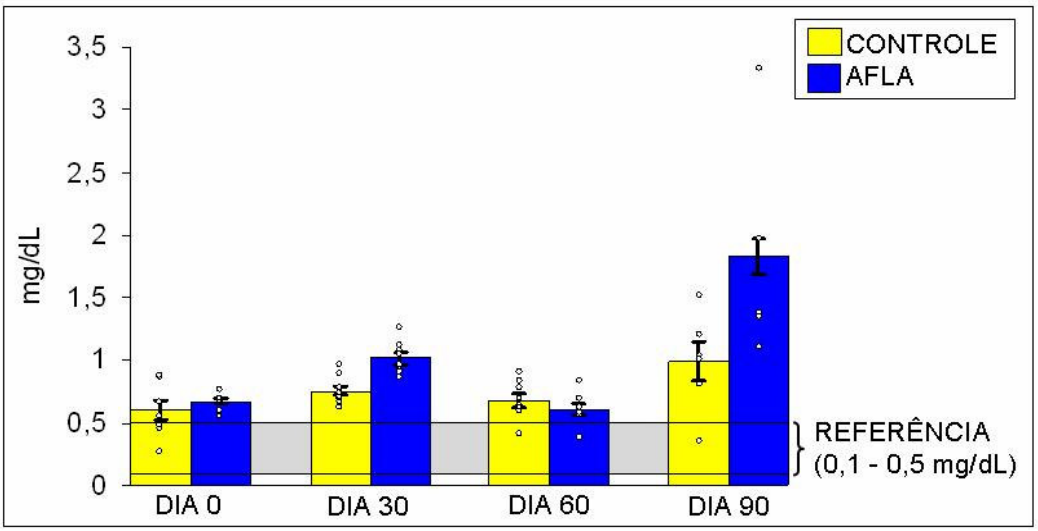


GRÁFICO 3 - TEMPO DE PROTROMBINA - ELEVAÇÃO GRADATIVA DO TEMPO DE PROTROMBINA NO GRUPO AFLATOXINA, DESDE O DIA 30 (MÉDIA ± EPM). A COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DEMONSTROU QUE NOS DIAS 30, 60 E 90 AS MÉDIAS DO GRUPO CONTROLE FORAM SIGNIFICATIVAMENTE INFERIORES ÀS MÉDIAS DO GRUPO AFLATOXINA. REFERÊNCIA: 5,47 – 8,27 segundos (LOPES et al., 2005).

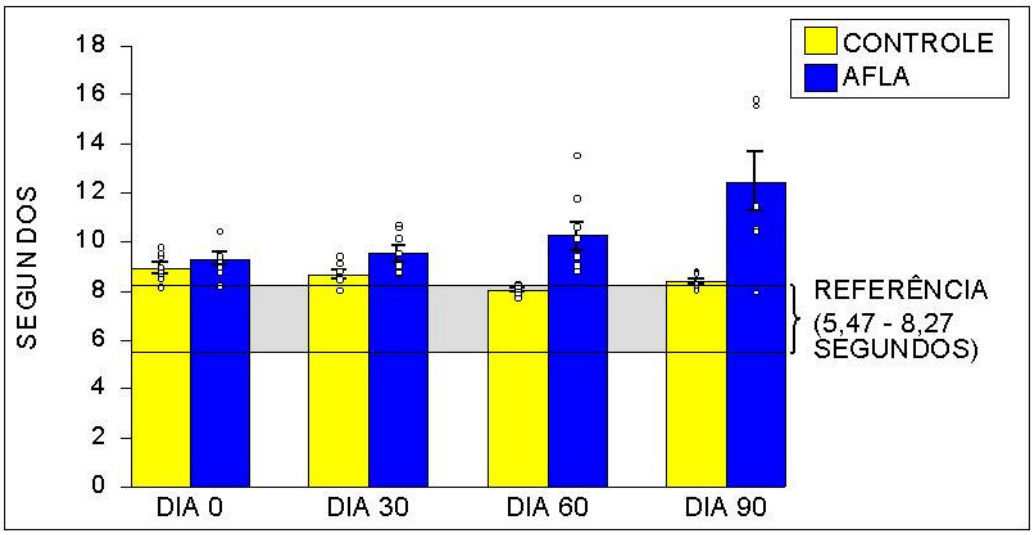


GRÁFICO 4 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA ELEVAÇÃO GRADATIVA DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA NO GRUPO AFLATOXINA, DESDE O DIA 30 (MÉDIA ± EPM) . A COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DEMONSTROU QUE NOS DIAS 30, 60 E 90 AS MÉDIAS DO GRUPO CONTROLE FORAM SIGNIFICATIVAMENTE INFERIORES ÀS MÉDIAS DO GRUPO AFLATOXINA. REFERÊNCIA: 13,5 – 16,7 segundos (LOPES et al., 2005).

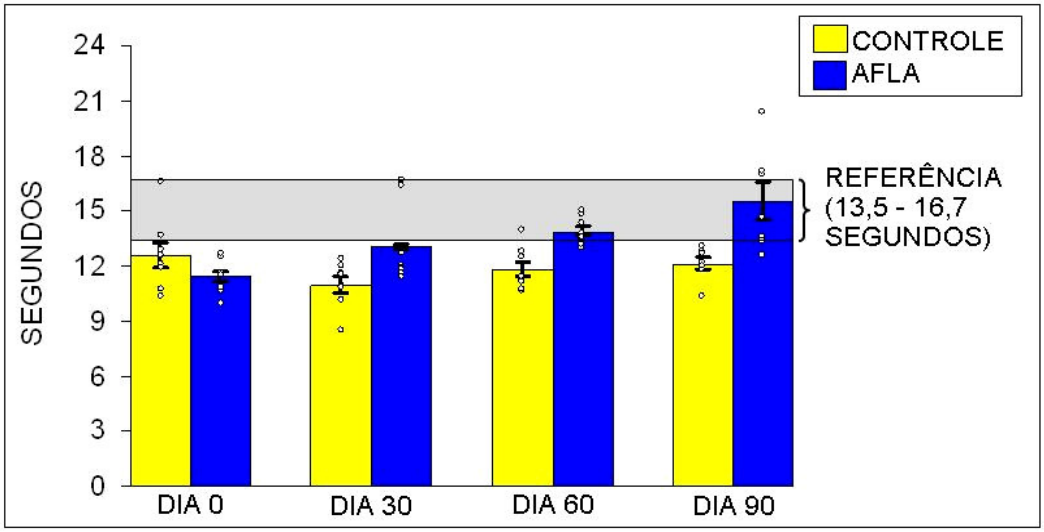


FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA. (A) GRUPO CONTROLE: REVELANDO LEVE GRAU DE VACUOLAÇÃO GLICOGÊNICA NESTA AMOSTRA DE FÍGADO SAUDÁVEL, COLORAÇÃO HE 400x. (B) GRUPO AFLATOXINA: REVELANDO TRANSFORMAÇÃO GORDUROSA (FLECHA), FIBROSE (ESTRELA), NECROSE PERIPORTAL (SETA) E INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS EM ESPAÇO PERIPORTAL, COLORAÇÃO HE 100x.

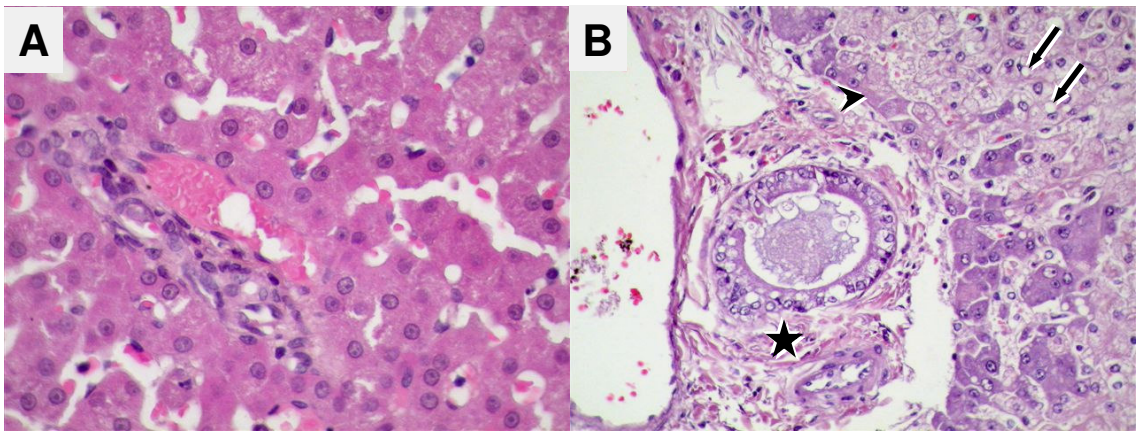
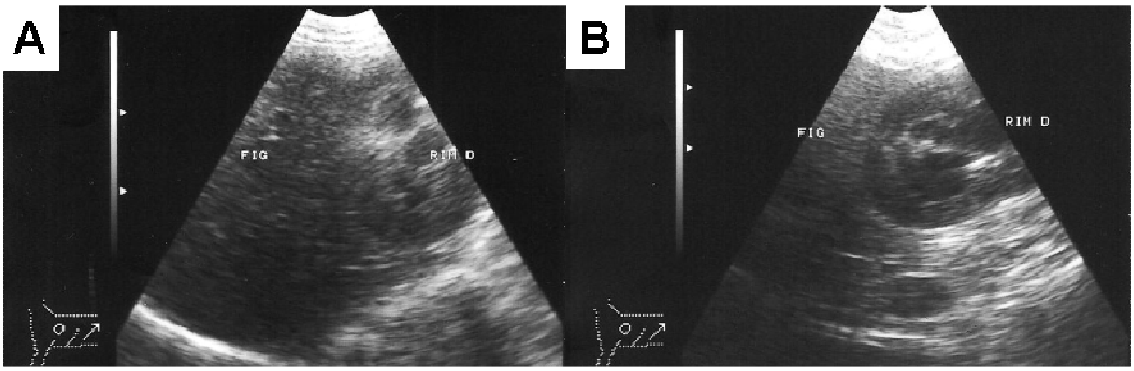


FIGURA 2 – IMAGENS DE ULTRA-SONOGRAFIA DEMONSTRANDO CORTES DA REGIÃO DE RECESSO NEFRO-HEPÁTICO. (A) ANIMAL DO GRUPO CONTROLE: REVELANDO ECOGENICIDADE HEPÁTICA SEMELHANTE AO CÓRTEX DO RIM DIREITO - FÍGADO SAUDÁVEL. (B) ANIMAL DO GRUPO AFLATOXINA: EVIDENCIANDO HIPERECOGENICIDADE HEPÁTICA EM RELAÇÃO AO CÓRTEX DO RIM DIREITO, IMAGEM DE FÍGADO COM TRANSFORMAÇÃO GORDUROSA E FIBROSE.



4 CAPÍTULO 2 – AFLATOXICOSE EXPERIMENTAL EM CÃES RETRIEVER DO LABRADOR – ACHADOS DE NECRÓPSIA EM UM CASO *(Experimental aflatoxicosis in Labrador Retriever dogs – Necropsy Findings in One Case)*

PATRICIA MUZOLON, ELIZABETH SANTIN, JULIANA WERNER, LEANDRO LIMA, LUIZ RODOLFO SACAVAZZA GERTNER

4.1 - RESUMO

A aflatoxicose ocorre nos animais após a ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos em grãos. As aflatoxinas são hepatotóxicas, imunodepressoras, carcinogênicas e anticoagulantes. Os sinais clínicos são vômito, depressão, poliúria, polidipsia, anorexia e icterícia. Foi realizada uma intoxicação experimental com 78,6 µg/Kg de aflatoxina adicionada à ração de cães da raça Retriever do Labrador durante 3 meses. Aos 79 dias houve o óbito de uma fêmea de 6,5 meses de idade, permitindo descrever os achados da necropsia e da histopatologia de um cão sabidamente intoxicado por aflatoxina. Os exames realizados previamente revelaram redução de eritrócitos, proteína plasmática total, contagem de plaquetas, proteína total sérica, albumina e globulina, aumento de AST, bilirrubinas e creatinina. A ultra-sonografia revelou hiperecogenicidade hepática em comparação a córtex do rim direito. Na necropsia havia fluido na cavidade abdominal, fígado pálido e amarelado com bordas arredondadas e consistência firme, vesícula biliar repleta e com paredes espessadas, mucosa estomacal edemaciada, com petéquias, erosões gástricas e resíduo de suco gástrico, alças intestinais pálidas, com hemorragia ao longo de todo o órgão, mucosa entérica espessada, hiperêmica, com petéquias e erosões, pulmão com focos de hemorragia e timo com petéquias. A histopatologia hepática demonstrou colestase, infiltrados inflamatórios, vacuolação dos hepatócitos, transformação gordurosa, necrose, fibrose e proliferação de ductos biliares, todos em espaço porta, a histopatologia intestinal demonstrou enterite crônica. A causa do óbito foi severa hemorragia intestinal causada por defeitos na coagulação culminando com choque intravascular disseminado.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxicose, cães, necropsia, hepatotoxicidade, hemorragia

4.2 – ABSTRACT

Aflatoxicosis is a disease that occurs after ingestion of toxic metabolites produced by fungi on grains. Aflatoxins have hepatotoxic, immunosuepressor, carcinogenic and anticoagulant properties. The clinical signs of intoxication include vomiting, depression, polyuria, polydipsia, anorexia and jaundice. An experimental intoxication investigation was performed using 78.6 µg/Kg of aflatoxin added to the food of Labrador Retriever dogs for a period of 3 months. At 79 days there was a death of a 6.5 month old female dog allowing the current description of the necropsy findings and histopathology results of a dog known to be intoxicated by aflatoxin. The exams conducted previously showed a reduction of erythrocyte, plasma total protein, platelet count, serum total protein, albumin and globulin, an increase of AST, bilirubins and creatinine. The ultrasonic examination revealed hyperechogenicity of the liver compared to the right kidney cortex. At the necropsy several abnormalities were observed: Fluid in the abdominal cavity; The liver was pale and yellow with rounded edges and firm consistency; The gallbladder was filled and with thickened walls; The stomach mucosa edematous with petechiae, gastric erosions and gastric juice residue; The intestines were pale, with hemorrhagic content, thickened mucosa, with a red discoloration along with petechiae and erosions; Small hemorrhagic foci in the lung and, lastly; Thymus with petechiae. The liver histopathology showed cholestasis, inflammatory infiltrates, hepatocytes vacuolation, fatty degeneration, necrosis, fibrosis and bile duct proliferation, all of that located mainly in periportal areas, the bowel histopathology showed chronic enteritis. The cause of death was severe intestinal bleeding caused by defects in coagulation culminating with disseminated intravascular shock.

KEY WORDS: aflatoxicosis, dogs, necropsy, hepatotoxicity, bleeding

4.3 - INTRODUÇÃO

A aflatoxicose é uma doença que ocorre em conseqüência da ingestão de metabólitos altamente tóxicos produzidos por fungos, principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nominus* e *Penicilium puberulum*. Esses fungos crescem em uma grande variedade de grãos, como milho, amendoim, soja, arroz, sorgo e semente de algodão, presentes em regiões tropicais e subtropicais (RUMBEIHA, 2000).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos. Os fungos crescem em substratos como grãos e subprodutos de grãos, por exemplo, milho, trigo, soja e arroz, geralmente usados na formulação da ração de cães (CAST, 2003).

A produção de metabólitos secundários pelos fungos teria a finalidade biológica de aumentar sua competitividade na natureza. A sobrevivência desses fungos no ambiente seria assegurada pela propriedade antibiótica (antifúngica e antibacteriana) das micotoxinas. Portanto, os metabólitos secundários são importantes nas relações dos fungos com o ambiente, como por exemplo, em resposta a um estresse sofrido pela planta como medida de autodefesa frente a concorrência com outros microorganismos, já que as micotoxinas não possuem função fisiológica conhecida para o próprio fungo (CAST, 2003).

As micotoxicoses já relatadas em cães envolvem as seguintes micotoxinas: aflatoxinas, deoxinivalenol (vomitoxina), ocratoxina A, citrinina, zearalenona, roquefortina e penitren A (RUMBEIHA, 2000). Os sinais clínicos variam muito e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento, mas a mortalidade é baixa (PATTERSON, 1977).

Foi realizada uma intoxicação experimental com 78,6 µg/Kg de aflatoxina adicionada à ração de cães da raça Retriever do Labrador durante 3 meses. O objetivo foi determinar quais as manifestações bioquímicas e estruturais decorridas da intoxicação experimental pela aflatoxina veiculada ao alimento contaminado. Além disso, analisar pelos dados obtidos, quais dessas alterações poderiam ser utilizadas futuramente como marcadores da intoxicação crônica com

dose subletal de aflatoxina em cães, possibilitando, assim, o diagnóstico precoce e evitando complicações mais graves da doença.

Houve um óbito aos 79 dias de experimento de uma fêmea com 6 meses de idade que recebeu ração contendo 78,6 µg/Kg de aflatoxina na ração durante esse período. A causa do óbito foi hemorragia intestinal severa em decorrência de choque intravascular disseminado.

O objetivo desse relato foi descrever os achados da necropsia e as conseqüentes alterações histológicas presentes em um cão sabidamente intoxicado por aflatoxina.

4.4 - REVISÃO DA LITERATURA

As aflatoxinas são causa de intoxicação, na maioria dos casos, subaguda a crônica, e acometem animais de produção, animais de companhia e seres humanos no mundo todo. Tais padrões de intoxicação tornam difícil o diagnóstico precoce, sendo sua prevalência subestimada por médicos e médicos veterinários. A gravidade da doença varia de acordo com a espécie, idade, estado hormonal (estro ou gestação), estado nutricional, quantidade de toxina ingerida e tempo de ingestão (SCHULTZ, 1988).

Nos animais de estimação (cães, gatos, aves, peixes), o fígado é o principal órgão alvo. As aflatoxinas também são imunodepressoras, nefrotóxicas, carcinogênicas e possuem efeito anticoagulante. Os cães e os gatos são extremamente sensíveis. A DL50 da aflatoxina B1 nos cães é 0,5-1,0 mg/kg e nos gatos é 0,3-0,6 mg/kg (PATTERSON, 1977). No Brasil as aflatoxicoses e outras micotoxicoses ainda são doenças pouco e/ou mal diagnosticadas e também pouco estudadas em pequenos animais.

Os sinais clínicos variam muito e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento, mas a mortalidade é quase sempre baixa (PATTERSON, 1977).

Na histopatologia de casos agudos (ingestão de quantidades acima de 1,0 mg/kg de aflatoxina) há presença de grave transformação gordurosa com nítida vacuolização dos hepatócitos, hiperplasia dos ductos biliares e congestão das

veias portal e central (RUMBEIHA, 2000). Em casos subagudos (ingestão de quantidades entre 0,5 e 1,0 mg/kg de aflatoxina) há transformação gordurosa, hiperplasia dos ductos biliares, início de regeneração hepática e fibroplasia portal. Nos casos crônicos (ingestão, continuada ou intermitentemente, de quantidades entre 0,5 e 30 µg/kg de aflatoxina) há extensa fibrose hepática e hiperplasia dos ductos biliares, fibrose portal com formação de pontes fibróticas e nódulos de regeneração (NEWMAN et al., 2007).

A exposição a aflatoxinas tem o potencial de determinar o desenvolvimento de neoplasia hepática nos animais de estimação que se recuperaram dos efeitos da exposição aguda, subaguda ou crônica (RUMBEIHA, 2000). As alterações da coagulação estão relacionadas à estrutura química e farmacodinâmica das aflatoxinas, que se comportariam como cumarínicos, exercendo um efeito anticoagulante (BABABUNMI et al., 1997).

A maioria dos estudos descritos preocupou-se em descrever os efeitos de micotoxinas isoladas, ignorando a real condição em que múltiplas micotoxinas são co-produzidas e interagem para agravar o quadro clínico (RUMBEIHA, 2000).

A interação entre micotoxinas acontece quando muitos ingredientes são misturados para um produto final ou quando fungos produzem múltiplas micotoxinas simultaneamente (por exemplo, fungos do gênero *Fusarium* e *Penicillium*). Níveis conhecidos e seguros podem ser alterados pela presença de outras micotoxinas. (COPPOCK & CHRISTIAN (2007)).

As interações são complexas e não totalmente conhecidas resultando em um conjunto de efeitos característicos que diferem sobremaneira daqueles observados quando se considera uma micotoxina isolada. Este fato resulta em maior dificuldade no diagnóstico e enfatiza a necessidade de identificar as interações, para que se possa reconhecê-las assim que se manifestarem (CAST, 2003).

O diagnóstico pode ser feito pela análise do alimento suspeito, realizando a identificação e quantificação das micotoxinas. Os métodos mais utilizados são o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), e os métodos químicos como a cromatografia em camada delgada (*Thin-layer chromatography - TLC*),

cromatografia líquida de alta resolução (*High-performance Liquid Chromatography - HPLC*) e cromatografia gasosa. Os métodos de identificação e quantificação das micotoxinas são seguros, mas correspondem somente à amostra analisada naquele momento (FIREMAN, 2007).

A amostragem do material suspeito torna-se complicada, pois a distribuição das micotoxinas pode ser altamente heterogênea, elas podem concentrar-se em aglomerados, dificultando ainda mais a obtenção de uma amostra representativa do lote de grãos ou ração (COPPOCK &CHRISTIAN, 2007).

O diagnóstico também pode ser realizado pela análise de tecidos, secreções ou excreções dos indivíduos afetados detectando os metabólitos das micotoxinas nas amostras. As micotoxinas são transformadas no organismo em diferentes composições químicas e podem ser encontradas em órgãos-alvo preferenciais (FIREMAN, 2007). Os achados de necropsia e a caracterização histopatológica poderão apenas sugerir a doença.

4.5 - MATERIAL E MÉTODO

O relato de necropsia refere-se a um cão que participou do modelo experimental construído utilizando cães da raça Retriever do Labrador, de 4 a 5 meses de idade, peso e gênero igualmente distribuídos em 2 grupos. Estes cães foram mantidos em condições ambientais, de alimentação e de higiene controladas, em um canil experimental localizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR – Campus São José dos Pinhais, Paraná.

O cão foi exposto a níveis subletais de aflatoxina purificada em sua alimentação (100 µg/Kg), de forma crônica, durante 3 meses, juntamente com outros 7 cães.

A ração disponibilizada para o experimento apresentava-se extrusada e peletizada, não contendo o banho final de óleo de frango e palatabilizante. O não emprego dessa etapa final no preparo da ração foi justificado pela necessidade de utilizar, posteriormente, o óleo como veículo para contaminação do alimento com aflatoxina purificada em pó. Amostras da ração pronta foram coletadas para posterior análise micotoxicológica.

Foram adotados procedimentos de segurança para manipulação da aflatoxina purificada por todos os funcionários que mantinham contato com a substância, como uso de máscara de carvão ativado, óculos de proteção, luvas de borracha e avental

Para padronização da leitura e comparação com os dados obtidos posteriormente, exame físico geral, ultra-sonografia abdominal, coleta de sangue e urina, assim como biópsia hepática percutânea e exame histopatológico dos fragmentos foram realizados antes do início do experimento. Após o início do experimento, os mesmos procedimentos foram realizados aos 30, 60 e 90 dias em cada grupo de cães.

Hemograma e análise bioquímica do soro, incluindo avaliação da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, creatinina, uréia sangüínea, proteína total e frações, gama-glutamil transferase (GGT), bilirrubinas, lipase, tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa) além de urinálise, foram feitos em todas as datas mencionadas. As amostras do fígado foram enviadas para exame histopatológico para pesquisa de sinais típicos de exposição às micotoxinas como a necrose hepática e a hiperplasia do ducto biliar.

4.5.1 - HISTÓRICO DO CÃO QUE VEIO A ÓBITO

A fêmea que veio a óbito apresentava-se com 6,5 meses de idade no momento em que morreu e havia recebido ração com aflatoxina durante 2,5 meses anteriores à sua morte. Era um filhote muito ativo e em momento algum apresentou qualquer um dos sinais típicos de aflatoxicose e/ou de outra doença. Aparentava saúde e vitalidade, alimentava-se bem e interagia com os outros cães e com os tratadores.

Em relação aos exames realizados previamente, o hemograma revelou redução de eritrócitos, da proteína plasmática total e da contagem de plaquetas. A bioquímica sérica revelou aumento de AST, bilirrubina total, direta, indireta e da creatinina, redução da proteína total, albumina e globulina. A urinálise revelou urina turva, pH básico, presença de bilirrubina, eritrócitos, células de descamação

renal e bactérias cocos. A ultra-sonografia revelou hiperecogenicidade hepática em comparação ao rim direito. Na histopatologia houve transformação gordurosa de forma muito leve com início de vacuolação citoplasmática e presença de infiltrado inflamatório muito leve. O peso e a temperatura corporal não demonstraram alterações.

A análise micotoxicológica da ração revelou a presença de 78,6 µg/Kg de aflatoxina, ao invés de 100 µg/Kg do cálculo original. Havia ainda a presença das micotoxinas zearalenona (média de 6,9 µg/Kg) e fumonisina (média de 5,4 µg/Kg).

Na semana anterior ao óbito houve discreta redução do apetite, mas não de forma significativa, afinal mesmo os cães do grupo controle apresentavam pequena variação na ingestão. A ração era oferecida duas vezes ao dia *ad libitum*, mas com sua quantidade máxima limitada ao cálculo de necessidade energética individual, baseado na idade, peso e gasto calórico por exercícios físicos.

No dia anterior ao óbito a fêmea ingeriu uma quantidade abundante de ração, inclusive demonstrando querer mais. Apresentava-se ativa e alerta como o habitual. Não havia presença de diarréia no canil ou seu resíduo na cadela, nem sinais clínicos comumente associados à aflatoxicose, tais como vômito, melena, icterícia, dor abdominal, depressão, anorexia, diarréia, convulsões ou ascite.

O óbito foi detectado às 10h, mas a provável hora do óbito teria sido entre 8 e 9h e 30min. Havia sangue por todo o canil decorrente da diarréia sanguinolenta. A fêmea apresentava mucosas pálidas, pêlos eriçados, resíduo de diarréia sanguinolenta na região do períneo e nos membros pélvicos, temperatura corporal de 35°C e ausência de *rigor mortis*. No canil em que a fêmea estava havia presença de diarréia sanguinolenta no chão e paredes.

O corpo foi embalado em sacos plásticos e levado ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Paraná para realização da necropsia. O corpo permaneceu embalado em saco plástico no interior da câmara fria, onde continuou até o momento da necropsia.

A necropsia teve início 4 h após a detecção do óbito. Nesse momento o animal já apresentava certo grau de *rigor mortis* e resfriamento corporal. Houve

início dos procedimentos usuais de necropsia, abertura das cavidades abdominal e torácica, orofaringe e crânio.

Amostras de todos os órgãos foram coletadas e armazenadas em solução de formalina a 10% para posterior processamento histotécnico dos fragmentos e montagem de lâminas de histopatologia. Imagens dos achados observados durante o procedimento de necropsia foram armazenadas. No processamento das amostras empregou-se a histotécnica de rotina, na qual os fragmentos foram desidratados por imersão em uma série crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes de 5mm foram obtidos e subseqüentemente corados com hematoxilina-eosina e a análise histológica foi feita em microscópio óptico com objetivas de 10, 20, 40 e 100 vezes.

4.6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a necropsia observou-se uma pequena quantidade de líquido na cavidade abdominal levemente opaco/transparente, esbranquiçado e espumoso, provavelmente em decorrência de uma hipertensão portal associada a uma fibrose periportal, bem como de uma hipoproteinemia secundária à inibição da síntese protéica pelo comprometimento hepático. Tais achados corroboram as observações também feitas por DENNING (1987); HAYES & WILLIAMS (1978); BASTIANELLO et al. (1987) e NEWMAN et al. (2007) (FIGURA 3).

O fígado apresentava-se pálido e amarelado, provavelmente em decorrência da retenção biliar e da transformação gordurosa intracitoplasmática. As bordas estavam ligeiramente arredondadas, sugerindo um leve aumento de tamanho pela hipertrofia do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. A consistência era firme em conseqüência da fibrose periportal estabelecida. A vesícula biliar estava repleta e com paredes levemente espessadas. Esses achados corroboram as observações feitas por vários autores (NEWBWERNE & BUTLER (1969); EDDS (1973); KETTERER et al. (1975); GREENE et al. (1977); PATTERSON (1977); GARLAND & REAGOR (2001) e NEWMAN, et al. (2007)) (FIGURA 4).

O estômago apresentou pequena quantidade de suco gástrico, demonstrando uma gastrite de grau leve e não havia conteúdo estomacal proveniente da alimentação. A mucosa estomacal estava edemaciada e apresentou petéquias e erosões gástricas. Tais achados também foram encontrados por BASTIANELLO et al. (1987) e NEWMAN, et al. (2007) (FIGURA 5). KAO & ROBINSON (1972) acreditam que as micotoxinas causam irritação no trato digestivo, o que pode influenciar na predisposição a lesões na mucosa e redução da absorção de nutrientes. Adicionalmente, OSWALD et al. (2003) descobriram que micotoxinas, particularmente a fumonisina podem aumentar a colonização intestinal por bactérias patogênicas em leitões. Não há motivos para duvidar que tal fenômeno possa ocorrer em cães também. A doença hepática também pode ser um fator desencadeante de lesões na mucosa gastrintestinal. A perda da função hepática gera saldo negativo de nitrogênio e redução da albumina, que desencadeiam redução da reposição fisiológica da mucosa gástrica com perda da sua função de barreira; hipertensão portal, que reduz a circulação na mucosa gástrica e aumento dos ácidos biliares e da histamina que estimulam a produção de gastrina; tais conseqüências são determinantes na formação de úlceras gástricas (CENTER, 1996).

As alças intestinais apresentavam superfície pálida e ausência completa de conteúdo alimentar, este que foi substituído por um conteúdo hemorrágico ao longo de todo o lume do órgão (FIGURA 6). O conteúdo hemorrágico apresentava consistência gelatinosa com presença de coágulos sangüíneos misturados ao muco entérico. A mucosa entérica estava espessada, hiperêmica e apresentava petéquias e múltiplas fissuras sugestivas de erosões entéricas, achados que corroboram as observações de EDDS (1973); GREENE et al. (1977); PATTERSON (1977); BASTIANELLO et al. (1987); COPPOCK & CHRISTIAN (2007) e NEWMAN, et al. (2007) (FIGURA 7).

O pâncreas, o baço e os rins estavam normais, a bexiga estava vazia e normal. Os cornos uterinos e ovários estavam normais e involuídos pela imaturidade sexual.

O pulmão apresentou pequenas áreas de hemorragia (FIGURA 8), o coração apresentou espessamento das válvulas cardíacas e o pericárdio apresentou petéquias. Havia presença de timo em fase de involução, cuja superfície apresentava múltiplas petéquias (FIGURA 9). Petéquias também estavam presentes na serosa e mucosa gástrica e intestinal. A observação de petéquias também esteve presente nos achados de EDDS (1973); BASTIANELLO et al. (1987) e NEWMAN, et al. (2007).

A histopatologia hepática revelou presença de colestase leve, infiltrados inflamatórios (mais intenso próximo ao espaço porta), severa vacuolação dos hepatócitos, moderado grau de transformação gordurosa de forma difusa, hepatócitos eosinofílicos em espaço porta (hepatócitos com tendência necrótica - pré-necrose), padrão periportal de necrose, fibrose periportal discreta com formação de pontes fibróticas e ausência de picnose. Havia presença de proliferação de ductos biliares em espaço porta, com presença de 3 a 4 ductos por espaço porta, mas sem formar um padrão histológico (FIGURA 10). Esses achados já constaram nos trabalhos de EDDS (1973); GREENE et al. (1977); BASTIANELLO et al. (1987); COPPOCK & CHRISTIAN (2007) e NEWMAN, et al. (2007) e corroboram o achado de tais alterações patológicas.

Já no intestino a histopatologia revelou uma intensa enterite, de forma crônica, com rompimento de vilosidades, mas sem sinal de extravasamento de hemáceas e a lâmina própria apresentava infiltração linfoplasmocítica (FIGURA 11). Demais amostras de órgãos estavam normais à histopatologia.

Embora não houvesse graves alterações prévias nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, havia hipoproteinemia e trombocitopenia e o animal apresentou um quadro de diátese hemorrágica caracterizado por hemorragia espontânea causada por defeitos no sistema de coagulação ou falhas na estrutura dos vasos sangüíneos, culminando com choque intravascular disseminado. Alterações de coagulação originando hemorragias e/ou choque intravascular disseminado foram verificadas por EDDS (1973); GREENE et al. (1977); PATTERSON (1977); BASTIANELLO et al. (1987); COPPOCK & CHRISTIAN (2007) e NEWMAN, et al. (2007). Ao final da necropsia, cerca de 8

horas após o óbito, o sangue que extravasou dos vasos apresentava fluidez e, curiosamente, ausência de coagulação (FIGURA 12).

Na aflatoxicose as alterações de coagulação podem ser justificadas pela composição química da aflatoxina ser do tipo cumarínica, que atua como um anticoagulante (GREENE et al., 1977; CENTER, 1996). As tendências a hemorragias podem também ocorrer em decorrência da redução de função hepática como um todo e pela deficiência na produção hepática de protrombina e fibrinogênio (GREENE et al., 1977; BASTIANELLO et al., 1987). O estímulo para o choque intravascular disseminado no fígado debilitado é a combinação da precoce liberação de fatores de coagulação pela lesão nos hepatócitos e da redução da liberação dessas substâncias devido à doença hepática estabelecida.

4.7 - CONCLUSÕES

O óbito dessa fêmea não estava previsto na intoxicação experimental, certamente foi uma surpresa para todos os colaboradores do estudo sobre aflatoxicose experimental do qual este animal fazia parte. A ausência de sinais clínicos revela o perigo das intoxicações subclínicas. Sabe-se também que a morte de forma súbita pode estar presente em muitos casos de aflatoxicose, mas geralmente ocorre quando altas doses de aflatoxina fazem parte da alimentação dos cães.

Muito provavelmente o óbito resultou da somatória de uma série de fatores, como idade, sexo, estado de saúde prévio, características individuais do animal, predisposição ao desenvolvimento de doença hepática severa da raça SHIH et al. (2007), sinergismo entre as micotoxinas encontradas, alimentação inadequada para a fase, e/ou erros de manejo.

O cão não apresentou exames prévios que detectassem ou sugerissem a iminência de um óbito, nem mesmo os relacionados à coagulação, sugerindo que graves alterações de coagulação podem evoluir muito rapidamente, em questão de dias. Tais alterações são clinicamente silenciosas e devem fazer parte do leque de diagnósticos diferenciais durante a rotina clínica nos casos em que sinais clínicos de hepatopatias e coagulopatias inespecíficas estão presentes, pois como

pôde ser visto tais sinais constituem eminente perigo, uma vez que podem preceder uma morte súbita. A coagulopatia vigente no presente caso teve uma manifestação particularmente severa no aparelho digestório. Outro achado adicional curioso foi a presença de múltiplas petéquias no timo. Talvez estas duas características venham a contribuir para que clínicos e patologistas no futuro possam relacionar a aflatoxicose como uma importante causa de coagulopatia que apresente tais características necroscópicas em pequenos animais.

4.8 - REFERÊNCIAS

BABABUNMI,E.A.; THABREW,I.; BASSIR,O. Aflatoxin induced coagulopathy in different nutritionally classified animal species. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.34, p.161-181, 1997.

BASTIANELLO,S.S.; NESBIT,J.W.; WILLIAMS,M.C.; LANGE,A.L. Pathologic findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 635-640, 1987.

CAST, Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems.** Ames: Task Force Report nº139, 2003. 199p.

CENTER,S.A. Acute Hepatic Injury: Hepatic Necrosis and Fulminant Hepatic Failure. In: In: STROMBECK,D.R.; CENTER,S.A; GUILFORD,W.G.; WILLIAMS,D.A.; MEYER,D.J. **Small Animal Gastroenterology.** 3.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996, p.654-704.

COPPOCK,R.W.; CHRISTIAN,R.G. Aflatoxins In: GUPTA,R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, 2007, p. 939-950.

DENNING,D.W. Aflatoxin and human disease. **Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Reviews**, v.4, p.175-209, 1987.

EDDS, G.T. Acute aflatoxicosis: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.162, n.4, p.304-309, 1973.

FIREMAN,A. Micotoxinas - A Importância do Gerenciamento, dos Métodos Diagnósticos Corretos e da Escolha do Produto Certo Para Evitar seus Efeitos Deletérios Sobre a Produção Animal. **Produção Animal – Avicultura**, 2007.

GARLAND,T.; REAGOR,J. Chronic canine aflatoxicosis and manegement of an epidemic. In: DE KOE,W.J.; SAMSON,R.A.; VAN EGMOND,H.P.; GILBERT,J.; SABINO,M. Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. Wageningnen, Netherlands: Ponsen and Looven, 2001, p.231-236.

GREENE,C.E.; BARSANTI,J.A.; JONES,B.D. Disseminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. **The Cornell Veterinarian**, v.67, p. 29-49,1977.

HAYES, A.W.; WILLIAMS,W.L. Acute toxicity of aflatoxin B1 and rubratoxin B in dogs. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v.1, p.59-70, 1978.

KAO, C.; ROBINSON,R.J. *Aspergillus flavus* Deterioration of Grain: Its Effect on Amino Acids and Vitamins in Whole Wheat. **Journal of Food Science**, v.37, n.2, p.261-263, 1972.

KETTERER,P.J.; WILLIAMS,E.S.; BLANEY,B.J.; CONNOLE,M.D. Canine Aflatoxicosis. **Australian Veterinary Journal**,v.51, p.355-357,1975.

NEWBERNE,P.M.; BUTLER,W.H. Acute and chronic effects of aflatoxina on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Research**, v.29, p. 236-250, 1969.

NEWMAN,S.J.; SMITH,J.R.; STENSKE,K.A.; NEWMAN,L.B.; DUNLAP,J.R.; IMERMAN,P.M.; KIRK,C.A. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.168175, 2007.

OSWALD, I.; DESAUTELS, C.; LAFFITTE, J.; FOURNOUT, S.; PERES, S.Y.; ODIN, M.; LE BARS, P.; LE BARS,J.; FAIRBROTHER, J.M. Mycotoxin fumonisin

B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in Pigs. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, p. 5870–5874, 2003.

PATTERSON,D.S.P. Toxin-producing fungi and susceptible animal species. In: WYLLIE,T.D., MOREHOUSE,L.G. **Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Micotoxicosis Vol 1**. New York:Marcel Dekker Inc,1977, p. 156-158.

RUMBEIHA,W.K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

SCHULTZ,J. Micotoxicoses. In: BEER,J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** 1.ed. São Paulo: Editora Roca, 1988, p.365 – 372.

SHIH,J.L.; KEATING,J.H.; FREEMAN,L.M.; WEBSTER,C.R.L. Chronic Hepatitis in Labrador Retrievers: Clinical presentation and Prognostic Factors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.33-39, 2007.

FIGURAS

FIGURA 3 – LÍQUIDO NA CAVIDADE ABDOMINAL LEVEMENTE OPACO, ESBRANQUIÇADO E ESPUMOSO. NOTE TAMBÉM A SUPERFÍCIE PÁLIDA DAS ALÇAS INTESTINAIS.

FIGURA 4 – FÍGADO COM COLORAÇÃO PÁLIDA E AMARELADA, BORDAS DOS LOBOS LIGEIRAMENTE ARREDONDADAS PELO LEVE AUMENTO DE TAMANHO, CONSISTÊNCIA FIRME. VESÍCULA BILIAR REPLETA E COM PAREDES LEVEMENTE ESPESSADAS.

FIGURA 5 – ESTÔMAGO COM PEQUENA QUANTIDADE DE SUCO GÁSTRICO, AUSÊNCIA DE CONTEÚDO ESTOMACAL ALIMENTAR. MUCOSA ESTOMACAL EDEMACIADA E COM PRESENÇA DE PETÉQUIAS E EROSÕES GÁSTRICAS.

FIGURA 6 – INTESTINO APRESENTANDO AUSÊNCIA DE CONTEÚDO ALIMENTAR, ESTE SUBSTITUÍDO POR CONTEÚDO HEMORRÁGICO, DE CONSISTÊNCIA GELATINOSA, APRESENTANDO COÁGULOS SANGÜÍNEOS MISTURADOS AO MUCO ENTÉRICO AO LONGO DE TODO O LUME DO ÓRGÃO. MUCOSA ENTÉRICA ESPESSADA, HIPERÊMICA, COM PETÉQUIAS E MÚLTIPLAS FISSURAS SUGESTIVAS DE EROSÕES ENTÉRICAS.

FIGURA 7 – PULMÃO COM PEQUENA ÁREA DE HEMORRAGIA.

FIGURA 8 – TIMO APRESENTANDO SUPERFÍCIE COM MÚLTIPLAS PETÉQUIAS.

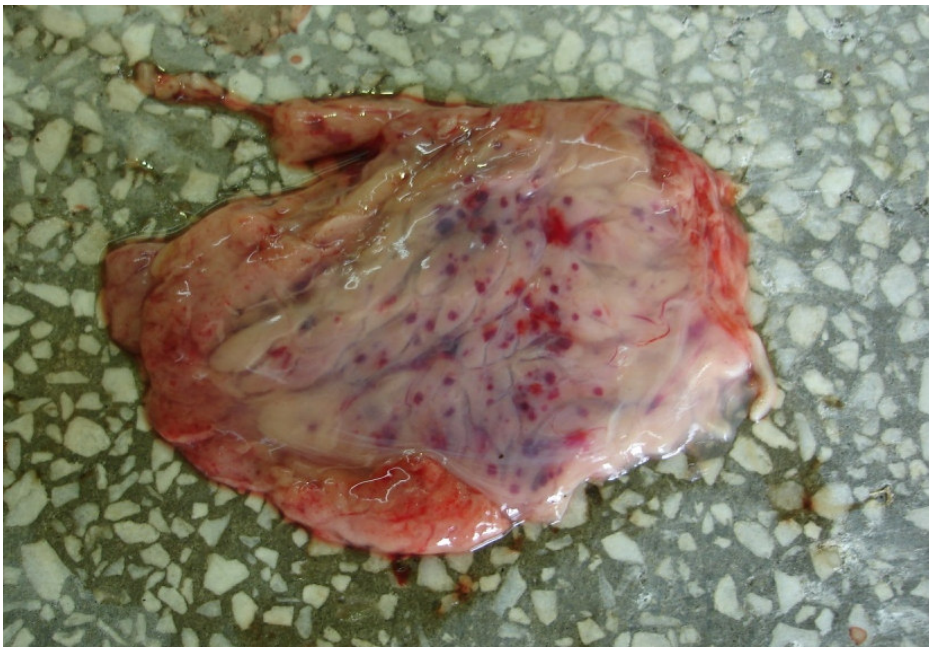


FIGURA 9 – HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA – NOTE A PRESENÇA DE TRANSFORMAÇÃO GORDUROSA, INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS, NECROSE PERIPORTAL E FIBROSE PERIPORTAL (SETA), COLORAÇÃO HE 100x.

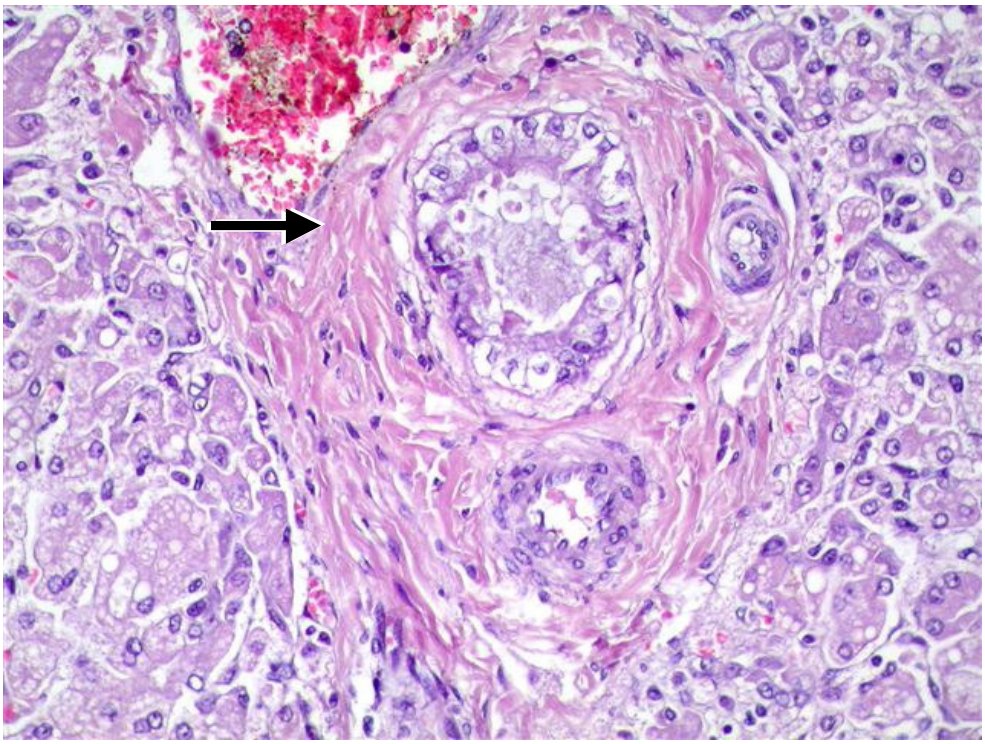


FIGURA 10 - HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA – NOTE PROLIFERAÇÃO DE DUCTOS BILIARES EM UM ESPAÇO-PORTA (SETAS), COLORAÇÃO HE 100x.

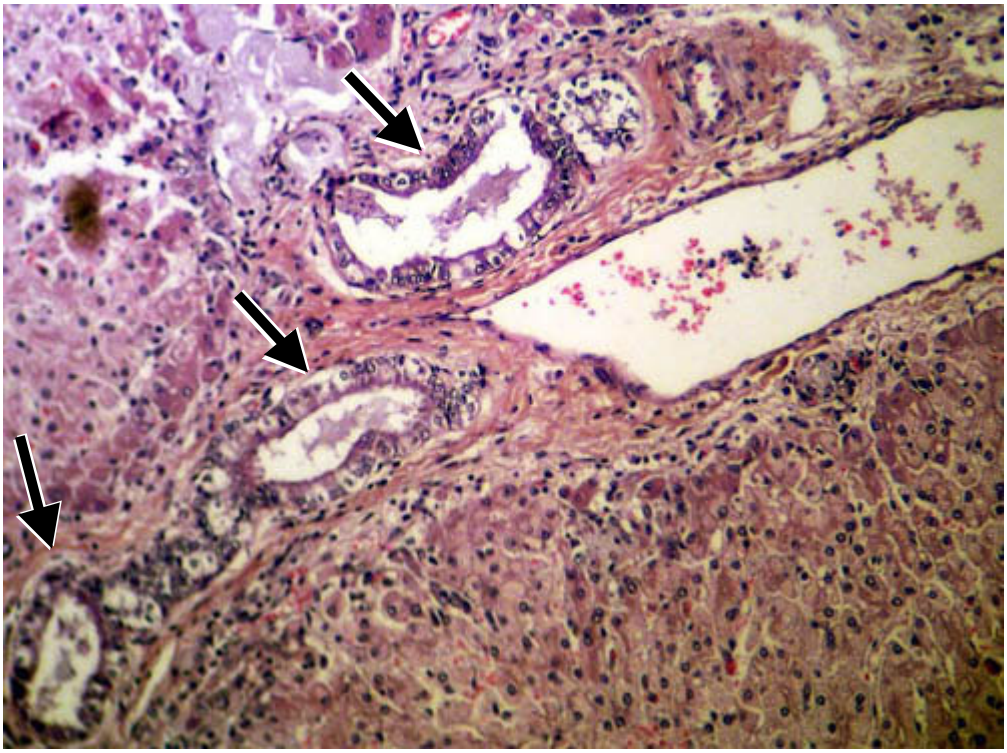


FIGURA 11 – HISTOPATOLOGIA INTESTINAL – APRESENTANDO ENTERITE DE FORMA CRÔNICA, ROMPIMENTO DE VILOSIDADES, AUSÊNCIA DE EXTRAVASAMENTO DE ERITRÓCITOS E INFILTRAÇÃO LINFOPLASMOCÍTICA NA LÂMINA PRÓPRIA, COLORAÇÃO HE 100x.

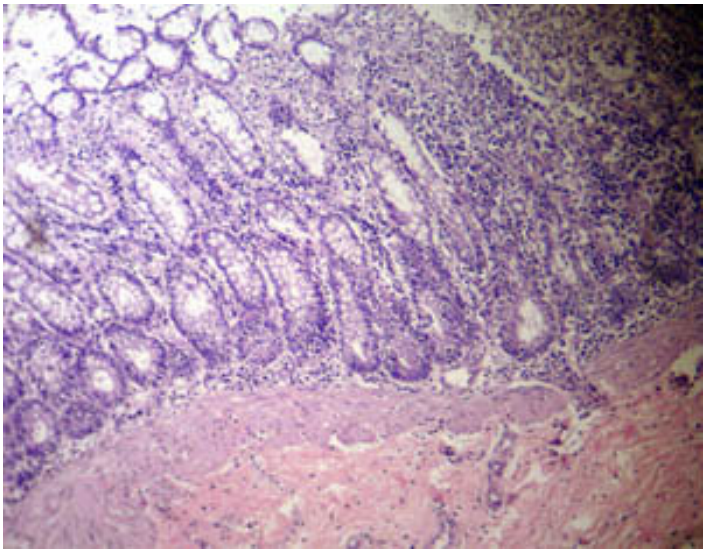
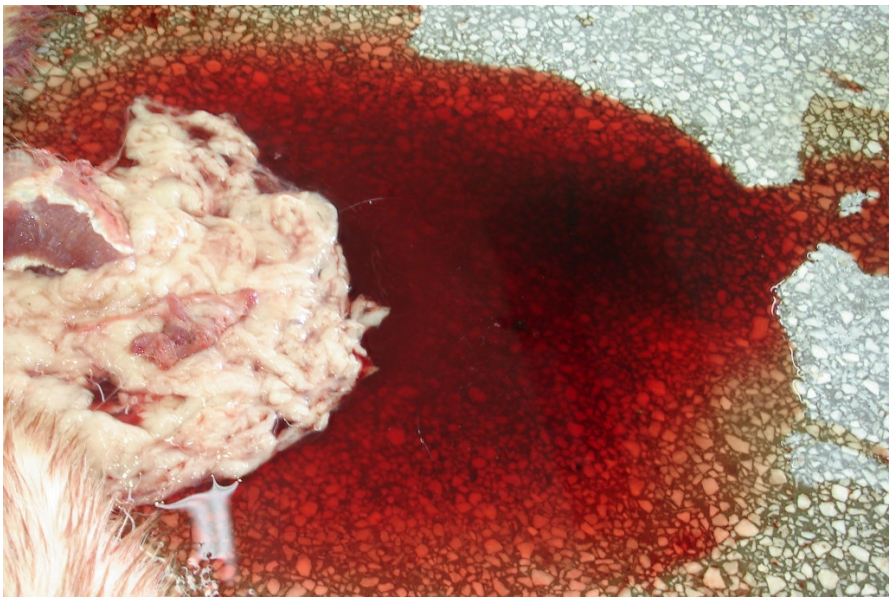


FIGURA 12 – SANGUE QUE EXTRAVASOU DOS VASOS APRESENTANDO CONSISTÊNCIA FLUIDA E AUSÊNCIA DE COAGULAÇÃO AO FINAL DA NECROPSIA, CERCA DE 8 HORAS APÓS O ÓBITO.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As micotoxicoses em cães são pouco conhecidas e seu diagnóstico é raro na rotina de clínicas veterinárias no Brasil. O baixo número de diagnósticos não a caracteriza como menos importante, apenas demonstra que o pouco conhecimento dos profissionais e a presença de sinais clínicos inespecíficos são fatores que dificultam sua suspeita e diagnóstico.

Existe uma busca científica de marcadores das micotoxicoses inespecíficas, como uma forma de facilitar seu diagnóstico, mas poucos estudos conseguiram descrever achados realmente importantes para tanto. Esse também foi um dos objetivos da intoxicação experimental e baseado nos seus resultados pode-se concluir que as mais importantes alterações estiveram relacionadas ao processo de coagulação sangüínea. O componente químico da aflatoxina é do tipo cumarínico e por isso a sua presença e metabolização no organismo a fazem agir como um anticoagulante. As alterações na coagulação foram as mais precocemente detectadas, demonstradas a partir de 30 dias de intoxicação, e em completa ausência de sinais clínicos.

Nesse caso insta salientar-se que diferentemente de muitas outras doenças o comportamento do animal não foi alterado, não houve demonstração de qualquer sinal clássico de um animal doente. Dessa forma justifica-se que a avaliação da coagulação faça parte da rotina de clínicas veterinárias nesses casos de difícil diagnóstico. As análises dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada são exames confiáveis, rápidos, de relativo baixo custo e se forem realizados adequadamente podem conter o avanço da doença, com a sugestão de mudança da ração, e assim evitar casos de óbito repentino.