

Efeito da ingestão de fumonisina B₁ no peso corporal e na histopatologia de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)

Effect of fumonisin B₁ on body weight and histopathology of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)

Carlos Augusto Fernandes Oliveira^I Paula Butkeraitis^I
David Randolph Ledoux^{II} George Rottinghaus^{III}

- NOTA -

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da fumonisina B₁ (FB₁) sobre o peso corpóreo e as vísceras (fígado, rim e coração) de codorna poedeira japonesa (*Coturnix coturnix japonica*), devido ao escasso dado toxicológico nesta espécie. Quatro grupos, sendo cada um constituído de 32 codornas de linhagem comercial, receberam ração contendo FB nas concentrações de 0 (controle), 10, 50 e 250mg kg⁻¹, durante 28 dias. Observou-se uma redução (P<0,05) no peso corpóreo das aves submetidas ao tratamento 250mg kg⁻¹ de FB₁. Os pesos relativos do rim e do coração mantiveram-se semelhantes em todos os tratamentos (P>0,05), porém as aves do grupo 50 e 250mg kg⁻¹ apresentaram aumento no peso relativo de fígado (P<0,05). Alterações histológicas foram constatadas apenas no fígado das aves alimentadas com ração contendo 50 e 250mg kg⁻¹ de FB₁, caracterizadas por hiperplasia moderada de ductos biliares e múltiplas áreas de necrose focal, indicando que a FB₁ seja tóxica a partir de 50mg kg⁻¹ para codornas de postura.

Palavras-chave: FB₁, toxicidade, alterações histopatológicas, codorna.

ABSTRACT

This research was aimed at evaluating the effect of fumonisin B₁ (FB₁) on body weight and viscera (liver, kidney and heart) of laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), due to the little toxicological data on this species. Four experimental groups of 32 commercial quails were designed and exposed to ingestion test with feed containing 0 (controls), 10, 50 or 250mg FB₁ kg⁻¹ feed, during 28 days. Birds of group 250mg FB₁ kg⁻¹ showed lower body weight

(P<0.05). Relative weights of kidney and heart were similar (P>0.05) among treatments. However, the relative weight of liver increased (P<0.05) in quail of groups received 50 and 250mg FB/kg. Histological changes were observed only in the liver of groups receiving 50 and 250mgFB₁kg⁻¹, which caused moderate biliary duct hyperplasia and multiple foci of hepatic necrosis. The data indicated that AFB₁ at levels above 50mg kg⁻¹ in laying Japanese quail.

Key words: FB₁, toxicity, histopathology, quail.

As fumonisinas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente da espécie *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella fujikuroi* Sawada) (RHEEDER et al., 2002). Mais de 28 diferentes tipos de fumonisinas já foram isolados, sendo a toxina predominante a fumonisina B₁ (FB₁), que também apresenta maior toxicidade. A FB₁ tem sido associada com baixo desempenho, aumento do peso relativo de vísceras e hepatite tóxica em aves domésticas (KUBENA et al., 1995). LEDOUX et al. (1992) observaram diarreia, diminuição do consumo de alimentos e do ganho de peso, aumento do peso do fígado, necrose hepática e hiperplasia hepatocelular em frango de corte alimentado com ração contendo 100–400mg kg⁻¹ de FB₁. Alterações de miocárdio,

^IFaculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte 225, 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil. E-mail: carlosaf@usp.br. Autor para correspondência.

^{II}College of Agriculture, Food and Natural Resources, University of Missouri, Columbia, MO, United States.

^{III}College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, MO, United States.

caracterizadas por perda de estriações transversais e adelgaçamento dos cardiomiócitos foram relatados em perus alimentados com níveis de FB₁ acima de 325mg kg⁻¹ (WEIBKING et al., 1994).

Com relação às codornas, níveis de FB₁ de 50 e 100mg kg⁻¹ causaram redução no consumo de ração, diminuição do peso corpóreo, redução do peso e despigmentação dos ovos e redução do peso da casca (BUTKERAITIS et al., 2004). O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da FB₁ sobre o peso corpóreo, fígado, rins e coração de codornas poedeiras alimentadas com rações contendo diferentes níveis da toxina.

Foram utilizadas 128 codornas de linhagem comercial Japonesa (*Coturnix coturnix japonica*), adquiridas com cinco semanas de idade e vacinadas, subdivididas em quatro grupos de 32 aves. As aves foram mantidas em adaptação por duas semanas, sendo alimentadas com ração convencional à base de milho e farelo de soja, contendo FB₁ abaixo de 1,0mg kg⁻¹, conforme as recomendações do NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1994). As aves foram alojadas em bateria contendo quatro gaiolas de arame providas de comedouros lineares e bebedouros tipo calha em “V” para água corrente.

A FB₁ utilizada no experimento foi produzida a partir do cultivo de cepa toxigênica de *F. verticillioides* (cepa M-1325^a) e mantida em material de cultivo à base de milho, homogeneizado e esterilizado, conforme os procedimentos descritos por WEIBKING et al. (1994). O material de cultivo foi preparado em jarras de 1L, onde 100g de grãos de milho e 100mL de água destilada foram autoclavados (120°C/30 min) e, em seguida, semeados com 2mL de água destilada contendo a cepa de *F. verticillioides*. As jarras foram agitadas manualmente e incubadas a 27°C por cinco semanas. Após a incubação, adicionou-se 400mL de acetona:clorofórmio (75:25) ao meio de cultura, seguido de agitação em homogeneizador de alta velocidade por 5 min. Após a filtração, o resíduo sólido foi submetido a secagem em estufa a 40°C e triturado em um moinho de disco até a obtenção de um pó fino.

A concentração de fumonisinas no material de cultivo em pó foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu[®]) com detecção por fluorescência (comprimentos de onda de 335 e 440nm para excitação e emissão, respectivamente), utilizando-se a técnica descrita por SHEPHARD et al. (1990). A extração foi realizada tomando-se 50g da amostra e adicionando-se

50mL de acetonitrila:água (1:1). Após agitação por 30min, a mistura foi filtrada, transferindo-se 2mL do filtrado para coluna de extração em fase sólida (SPE), previamente condicionada com 2mL de metanol e 2mL de água destilada. Após a lavagem inicial com 2mL de acetonitrila:água (20:80), o extrato foi eluído com 2mL de acetonitrila:água (70:30). Em seguida, uma alíquota de 200µL do extrato final foi misturada com 200µL de reativo OPA, previamente preparado com 40 µg de o-phthaldialdeído em 5mL de solução de tetraborato de sódio a 0,1M e 50µL de 2-mercaptoetanol. Após dois minutos, foram aplicados 20µL no sistema CLAE, utilizando-se coluna de fase reversa C18, com dimensões de 150 X 4,6mm e tamanho de partícula 5µm (Phenomenex[®]). A fase móvel foi composta por acetonitrila:água:ácido acético (50:50:1), empregada com fluxo constante de 1mL min⁻¹. Os limites de quantificação do método para FB1 e FB2 foram de 20 e 30µg kg⁻¹, respectivamente. As concentrações de FB1 e FB2 no material de cultivo foram de 6.500mg kg⁻¹ e 2.100mg kg⁻¹, respectivamente.

A adição de material de cultivo contendo FB1 à ração (0,2-3,0kg 100kg⁻¹ de ração) foi realizada em um misturador horizontal/helicoidal (Marconi[®]), em uma única batida, um dia antes do início do período experimental, totalizando cerca de 90kg de ração. Utilizou-se a mesma ração empregada no período de adaptação das aves, constituída à base de milho e farelo de soja, balanceada conforme o NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1994). A confirmação dos níveis de FB₁ nas rações experimentais foi realizada de acordo com a mesma técnica descrita acima, com quantificação através de CLAE (SHEPHARD et al., 1990). Após a análise das rações preparadas, os níveis de FB₁ nos tratamentos que continham 10, 50 e 250mg/kg foram de 8,6mg kg⁻¹, 53,5mg kg⁻¹ e 254,2mg kg⁻¹, respectivamente. As rações de cada batida também foram analisadas quanto à presença de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona, através de cromatografia de camada delgada (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), sendo que nenhuma delas foi detectada nas amostras. Os limites de quantificação do método de análise para aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona foram de 4,0µg kg⁻¹, 5,0µg kg⁻¹ e 55,0µg kg⁻¹, respectivamente.

O experimento com intoxicação iniciou-se com aves com sete semanas de idade, no qual as aves receberam diariamente cerca de 30g ração ave⁻¹ e água *ad libitum* durante 28 dias. Após o período, as aves foram pesadas, anestesiadas com éter etílico e sacrificadas por deslocamento cervical e imediatamente

necropsiadas, para análise de vísceras (pesagem e exame macroscópico de possíveis lesões). Tecidos do fígado, rim e coração foram recolhidos em frascos contendo formalina a 10% tamponada e submetidos ao exame histopatológico (VASCONCELOS, 1988). Secções representativas de tecidos (espessura de 5µm) foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas ao microscópio de luz. O peso absoluto de vísceras foi convertido para peso relativo (g 100g⁻¹ de peso corpóreo – pc) e submetido à análise de variância (SAS, 1992), comparando-se as médias através do teste de Tukey (P<0,05).

O peso corporal das aves no dia 1 de intoxicação e imediatamente após o sacrifício (dia 28), bem como os pesos relativos do fígado, rim e coração, encontram-se na tabela 1. Aos 28 dias, observou-se uma redução (P<0,05) no peso corpóreo das aves submetidas ao tratamento com 200mg kg⁻¹ de FB₁, em relação aos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram observados em patos Pekin intoxicados com 100–400mg kg⁻¹ de FB₁ (BERMUDEZ et al., 1995) e em perus alimentados com ração contendo 75–425mg kg⁻¹ (KUBENA et al., 1995). Embora o mecanismo de ação de fumonisinas ainda não seja totalmente elucidado, a hipótese mais aceita consiste na interferência no metabolismo dos esfingolipídeos, devido à inibição da enzima N-aciltransferase (WANG, 1991). STEVENS & TANG (1997) demonstraram que a concentração reduzida de esfingolipídeos, ocasionada pela exposição à FB₁, promoveu o bloqueio quase completo do transporte nos receptores folato, o que pode levar ao comprometimento de processos celulares dependentes dessa vitamina, com conseqüente redução do ganho de peso corpóreo.

Os pesos de rim e coração mantiveram-se semelhantes (P>0,05) em todos os tratamentos, em relação ao controle. No entanto, o peso de fígado de aves intoxicadas com FB₁ apresentou-se maior em relação ao controle, sendo a diferença significativa

(P<0,05) somente para os grupos 50 e 250µg kg⁻¹. Estes resultados concordam com os dados reportados sobre os efeitos da FB₁ sobre o fígado de outras espécies de aves domésticas, a exemplo de frango de corte (LEDOUX et al., 1992) e peru (WEIBKING et al., 1994). O aumento no peso hepático, observado em todas as espécies de aves estudadas, parece estar associado com as alterações no metabolismo lipídico promovidas pela fumonisina (KUBENA et al., 1995).

As amostras de rim e coração de ave controle, assim como das intoxicadas com 10, 50 e 250mg kg⁻¹ de FB₁, não apresentaram alterações significativas (P>0,05). Com relação ao fígado, as amostras provenientes dos grupos controle e 10mg kg⁻¹ de FB₁ também não apresentaram lesões aparentes; porém, algumas áreas isoladas apresentaram-se com discreta degeneração vacuolar do tecido hepático. RANDALL & REECE (1996) também descreveram relato semelhante, relacionando o fato acima, provavelmente, à esteatose fisiológica observada em praticamente todas as aves em postura.

Os fígados de aves alimentadas com 50 e 250mg kg⁻¹ de FB₁ apresentaram hiperplasia moderada de ductos biliares e múltiplas áreas de necrose focal. A severidade das lesões hepáticas foi maior nas aves alimentadas com 250mg kg⁻¹, em relação ao grupo que recebeu 50mg kg⁻¹, indicando um efeito proporcional à dose de FB₁. Os dados apresentados estão de acordo com os resultados obtidos em frango de corte (LEDOUX et al., 1992) e peru (WEIBKING et al., 1994). Este efeito hepatotóxico pode ser atribuído primariamente, também, à inibição da enzima N-aciltransferase, uma vez que isso determina um desarranjo no metabolismo de esfingolipídeos, incluindo a regulação celular (WANG, 1991).

Os resultados obtidos indicaram que a FB₁ adicionada na ração de codornas em concentrações acima 50mg kg⁻¹ produziu um quadro de hepatite tóxica semelhante ao observado em peru e frango de corte.

Tabela 1 – Efeito da ingestão de FB₁ no peso corpóreo e no peso visceral de codornas japonesas¹.

FB ₁ na ração (mg/kg)	Peso corpóreo (g)		Pesos relativos (g/100 g de peso corpóreo)		
	Dia 1	Dia 28	Fígado	Rim	Coração
0 (controle)	143,6 ± 9,8 ^a	160,0 ± 1,0 ^a	2,68 ± 0,35 ^a	0,66 ± 0,14 ^a	1,00 ± 0,16 ^a
10	145,5 ± 6,6 ^a	157,3 ± 5,7 ^a	2,98 ± 0,46 ^{ab}	0,71 ± 0,17 ^a	1,00 ± 0,16 ^a
50	147,0 ± 4,8 ^a	153,7 ± 4,3 ^a	3,34 ± 0,39 ^{bc}	0,81 ± 0,19 ^a	1,04 ± 0,38 ^a
250	145,9 ± 4,3 ^a	143,3 ± 4,0 ^b	3,55 ± 0,52 ^c	0,74 ± 0,19 ^a	1,02 ± 0,16 ^a

^{a,b}Em uma coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (P>0,05).

¹ Valores se referem à média ± desvio padrão para 12 aves em cada tratamento.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aFusarium Research Center, Pennsylvania State University. University Park, PA, 16802, USA.

REFERÊNCIAS

BERMUDEZ, A.J. et al. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ in ducklings. **Avian Diseases**, v.39, p.879-886, 1995.

BUTKERAITIS, P. et al. Effect of dietary fumonisin B₁ on laying Japanese quail. **British Poultry Science**, v.45, p.798-801, 2004.

KUBENA, L.F. et al. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey polts. **Poultry Science**, v.74, p.1295-1303, 1995.

LEDOUX, D.R. et al. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.330-333, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9.ed. Washington : National Academy of Sciences, 1994. 155p.

RANDALL, C.J.; REECE, R.L. **Colour atlas of avian histopathology**. London : Mosby-Wolfe, 1996. 232p.

RHEEDER, J.P. et al. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.68. p.2101-2105, 2002.

SAS Institute. **SAS® User's guide: statistics**. Cary, NC, 1992. 1686p.

SHEPARD, G.S. et al. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2077-2087, 1990.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxins, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thinlayer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, p.22-26, 1989.

STEVENS, V.L.; TANG, J. Fumonisin B₁ – induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.18020-18025, 1997.

VASCONCELOS, A.C. **Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária**. Brasília: ABEAS, 1988. 73p.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.14486-14490, 1991.

WEIBKING, T.S. et al. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, and aflatoxin B₁ in the young turkey poult. **Poultry Science**, v.73, p.1517-1525, 1994.