

ENZIMAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA NA AFLATOXICOSE AGUDA EXPERIMENTAL EM FRANGOS DE CORTE

HEPATIC ENZIMES FUNCTION IN EXPERIMENTAL ACUTE ENZYMES AFLATOXICOSIS IN BROILERS

Adriana Borsa¹ Sonia Terezinha dos Anjos Lopes² Janio Morais Santurio³
Carlos Augusto Mallmann⁴ Juarez Morbini Lopes⁵ Roberta Ribeiro Fernandes⁶

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a função hepática de aves experimentalmente intoxicadas por aflatoxina, com e sem uso de bentonita sódica, foram utilizados 40 (quarenta) frangos de corte, machos, linhagem Ross, divididos em 4 (quatro) grupos de 10 (dez) animais, sendo que cada grupo foi submetido a um tratamento: T₁ - controle (ração sem aflatoxina ou bentonita), T₂ - ração com 5ppm de aflatoxina, T₃ - ração com 5ppm de aflatoxina e 0,5% de bentonita sódica e T₄ - ração com 0,5% de bentonita sódica. Todos estes tratamentos foram aplicados do 1° ao 42° dia de vida das aves. Aos 21, 35 e 42 dias de idade, foram analisados os níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamiltransferase (GGT). A análise da variância mostrou que houve interação entre os tratamentos e datas de colheita de material, para as seguintes variáveis: AST, LDH e GGT. Para estas, foi aplicado o teste de Tukey, comparando-se as médias de cada tratamento em cada data. Observou-se que as enzimas AST, ALT e GGT não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, porém, nos tratamentos 1 e 2, a AST apresentou um aumento linear ($p < 0,05$) ao longo de todo o experimento, sendo este mais acentuado no tratamento 2. A enzima ALT não apresentou nenhuma variação para qualquer tratamento por todo o período. A GGT, nos tratamentos 2 e 3, sofreu aumento linear ($p < 0,05$) dos níveis ao longo do experimento. Os níveis da enzima LDH, aos 21 dias, foram mais elevados ($p < 0,05$) nos tratamentos 2 e 3 em relação aos tratamentos 1 e 4. A análise dos resultados permitiu concluir que é possível detectar hepatotoxicidade provocada pela aflatoxina, através do monitoramento dos níveis das enzimas AST e GGT no soro das aves com faixa etária entre 21 e 42 dias e pela avaliação dos níveis de LDH aos 21 dias de

idade; sendo que o uso da bentonita na ração com aflatoxinas não modifica o comportamento destas enzimas.

Palavras-chave: frangos de corte, aflatoxinas, enzimas séricas, função hepática, bentonita sódica.

SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the hepatic function of experimentally intoxicated broilers by aflatoxin with and without sodium bentonite. Forty Ross male broilers, were used divided into 4 groups of 10 birds, and such groups have been submitted to the following treatments: T₁- control (feed without aflatoxin or sodium bentonite), T₂- feed containing 5ppm of aflatoxin, T₃- feed containing 5ppm of aflatoxin and 0.5% of sodium bentonite and T₄- feed containing 0.5% of sodium bentonite. All these treatments have been applied from the 1st to the 42nd day of life. On the days 21, 35 and 42, the serum levels of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and gamma glutamiltransferase (GGT). The analysis of variance showed an interaction between treatments and time of blood sampling for the following variables: AST, LDH and GGT. Tukey test was used to compare significant averages among treatments. It was observed that the enzymes AST, ALT and GGT have not shown significant differences among treatments. However, in treatment 2, AST showed a linear increase ($p < 0.01$) along the experiment, more pronounced in treatment 2. The ALT had no variation in any treatment during the total period. The GGT enzyme in treatments 2 and 3 had a linear increase ($p < 0.05$) for all periods. The LDH levels, at the 21st day, was higher for treatments 2 and 3 compared to treatments 1 and 4. According to the results, it can be concluded that is possible to detect the

¹ Médico Veterinário, Aluna do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Caixa Postal 5026, 97111-970, Santa Maria, RS. Autor para correspondência.

² Médico Veterinário, Mestre, Professora, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM.

³ Médico Veterinário, Especialista, Professor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM.

⁴ Médico Veterinário, Doutor, Professor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM.

⁵ Agrônomo, MSc, Professor, Departamento de Zootecnia, UFSM.

⁶ Aluna de Graduação, Curso de Medicina Veterinária, bolsista de iniciação científica PIBIC-CNPQ, UFSM

hepatotoxicity of aflatoxin in through monitoring of enzymes AST and GGT levels, in the serum of birds between 21 and 42 days of age, and by evaluation of LDH at 21 days.

Key words: broilers, aflatoxins, seric enzymes, liver function, sodium bentonite

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas constituem um grupo de metabólitos tóxicos produzidos por algumas cepas dos fungos *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus*, que crescem nos alimentos em geral, em condições adequadas de temperatura, umidade e na dependência de substrato. Segundo BORDIN (1995), as aflatoxinas pertencem ao grupo das cumarinas e são designados, em termos de espectrofotometria, como B₁, B₂, G₁ e G₂, os quais representam os quatro tipos de aflatoxinas produzidas. O principal órgão-alvo das aflatoxinas é o fígado; podendo ocorrer sérias lesões, caracterizadas por degeneração gordurosa e proliferação dos ductos biliares, sendo que, em frangos, a consequência destas lesões é a mudança no metabolismo do fígado e, como resultado, alterações na bioquímica clínica e nos fatores de coagulação sanguínea.

Um recente caminho descoberto para colaborar no controle de aflatoxicoses das aves é a utilização de materiais inertes na dieta, para reduzir a absorção de aflatoxinas pelo trato gastrointestinal das aves, denominados adsorventes. Entre eles, citam-se o carvão ativado, que teve resultados pouco expressivos (KUBENA *et al.*, 1990; JINDAL *et al.*, 1994), e as argilas de origem vulcânica, representadas pelos aluminossilicatos e bentonitas. O mecanismo de ação dos adsorventes consiste em adsorver a aflatoxina no intestino do animal, formando um complexo estável, que é eliminado, impossibilitando, assim, a sua absorção.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a função hepática de aves intoxicadas com aflatoxinas na ração, com e sem o uso de adsorvente (bentonita sódica), através dos níveis de enzimas séricas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamiltransferase (GGT).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 frangos de corte, machos da linhagem Ross, sexados no primeiro dia de idade, sendo vacinados, no primeiro dia de vida, contra Marek, Boubá e Gumboro. Os tratamentos, ministrados do 1º ao 42º dia de vida das aves, foram

os seguintes: Tratamento 1: grupo controle. Ração isenta de aflatoxina e bentonita sódica natural^a; Tratamento 2: ração acrescida de 5ppm de aflatoxina; Tratamento 3: ração acrescida de 5ppm de aflatoxina e 0,5% de bentonita sódica natural e Tratamento 4: ração isenta de aflatoxina, acrescida de 0,5% de bentonita sódica natural. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento.

Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância, considerando-se um experimento em parcelas subdivididas, sendo as parcelas principais constituídas pelos quatro tratamentos e as subparcelas pelas datas de coleta das amostras. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (p=0,05), através do programa SAS^{®b} e a tendência das variáveis medidas através do tempo foi estudada pela regressão, sendo verificado o ajustamento pelos seguintes modelos: linear: $Y = a + bx$, quadrático: $Y = a + bx + cx^2$, logarítmico: $Y = ax^b$, exponencial: $Y = ab^x$.

As matérias-primas usadas para fabricação das rações experimentais foram analisadas previamente no Laboratório de Análises Micológicas (LAMIC) da UFSM, sendo os resultados negativos para a presença de aflatoxinas.

A aflatoxina foi produzida em fermentação de arroz parbolizado, com *Aspergillus parasiticus* da linhagem NRRL 2999, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria pelo professor Janio Moraes Santurio, segundo técnica de SHOTWELL *et al.* (1966), modificada por WEST *et al.* (1973). A composição de aflatoxina foi a seguinte: B₁=69,60%, B₂=0,60%, G₁=29,20% e G₂=0,45%. Aos 21, 35 e 42 dias de idade das aves, foram colhidas amostras de sangue de 10 animais de cada tratamento através de punção da veia ulnar, sendo centrifugadas a 3000rpm para obtenção dos soros, que, acondicionados em recipientes identificados, foram congelados a -20°C até o momento das análises, realizadas trinta dias após a colheita.

Foram realizadas dosagens das enzimas de função hepática alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH). As dosagens de transaminases (ALT e AST) e LDH foram realizadas através do método colorimétrico, utilizando-se kits comerciais Bioclin^c, determinando-se a absorbância em 505nm e leituras em espectrofotômetro^d, à temperatura de 37°C, enquanto a dosagem da GGT foi realizada por método enzimático, através de kits comerciais da marca Celm^e, utilizando-se filtro de 405nm, fator 2077 e

temperatura de 25°C; sendo as leituras realizadas em enzimômetro^f.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância mostrou que houve interação entre os tratamentos e datas de colheita de material, para as seguintes variáveis: AST, LDH e GGT. Para estas, foi aplicado o teste de Tukey, comparando-se as médias de cada tratamento em cada data. Para a enzima ALT, onde a análise não mostrou interação, foi aplicado o teste somente para as médias de efeitos principais.

Ao estudar a tendência do comportamento dos tratamentos em relação ao tempo de vida das aves, foram encontradas regressões significativas para a enzima AST no tratamento T₁ (controle); AST e GGT para o tratamento T₂ (intoxicadas com 5ppm de aflatoxina), e GGT no tratamento T₃ (aves intoxicadas com 5ppm de aflatoxinas e 0,5% de bentonita sódica).

Os níveis da enzima AST não sofreram variação significativa entre tratamentos, entretanto, verificou-se que os níveis da variável AST para os tratamentos 1 e 2 tiveram tendência a aumentar com o aumento da idade das aves, sendo este aumento linear. Para o tratamento 1, houve significativo aumento ($p < 0,05$) nos níveis ao longo do experimento, havendo acréscimo de 1,76UI/L por dia e, para as aves do tratamento 2, significativo aumento ($p < 0,01$), com o incremento de 3,5UI/L por dia (Figura 1). Este fato comprova os efeitos hepatotóxicos das aflatoxinas, já que os níveis séricos nas aves do tratamento 2 (ração com

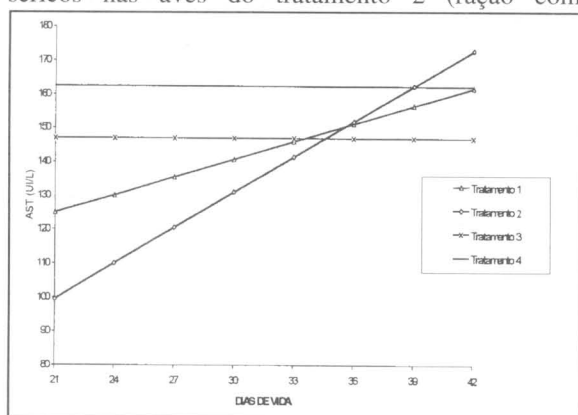


Figura 1 - Comportamento dos níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST) para os tratamentos T₁ (controle), T₂ (intoxicadas com 5ppm de aflatoxina), T₃ (intoxicadas com 5ppm de aflatoxina e 0,5% de bentonita sódica) e T₄ (ração sem aflatoxina com 0,5% de bentonita sódica) ao longo do experimento, pela análise da regressão. Santa Maria, 1996.

aflatoxinas) foram duas vezes maiores que o do grupo controle. Para os tratamentos 3 e 4, não houve variação dos níveis desta enzima ao longo do experimento, sugerindo possível influência da bentonita.

As alterações nos níveis da enzima ALT entre tratamentos não foram significativas, assim como não foi verificada nenhuma variação nos níveis desta enzima ao longo dos dias de colheita, para quaisquer tratamentos. Este fato é corroborado por FERNANDEZ *et al.* (1994), sustentando assim a afirmação de BRUGGERE-PICOUX *et al.* (1987) de que a ALT tem um valor limitado para o diagnóstico bioquímico em aves.

Quanto à enzima LDH, no tratamento 2, aos 21 dias, encontrou-se uma média significativamente superior ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos 1 e 4, não havendo, porém, diferenças significativas em relação ao tratamento 3. Nos demais dias de colheita, não houve diferenças significativas entre tratamentos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos para a enzima GGT; no entanto, para o tratamento 2, os níveis de GGT tiveram um significativo aumento ($p < 0,05$), sendo este considerado linear, havendo o incremento 0,87UI/L por dia, o mesmo ocorrendo para o tratamento 3 (Figura 2). Estes aumentos, segundo KANEKO (1989), indicam colestase biliar e hiperplasia de ductos, alterações comprovadamente provocadas pela aflatoxina, conforme EDDS (1973); DAFALLA *et al.* (1987); FERNANDEZ *et al.* (1994) e BORDIN (1995). Os achados desta pesquisa contrapõem-se aos de FERNANDEZ *et al.* (1994) que não encontraram alterações nos níveis de AST, LDH e GGT de frangos de corte submetidos a uma intoxicação com aflatoxina em condições similares.

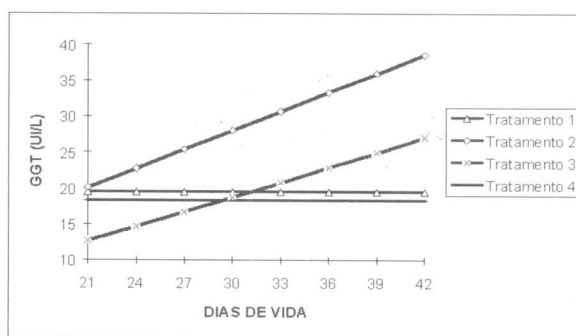


Figura 2 - Comportamento dos níveis da enzima Gama glutamiltransferase (GGT) para os tratamentos T₁ (controle), T₂ (intoxicação com 5ppm de aflatoxina), T₃ (intoxicação com 5ppm de aflatoxina e 0,5% de bentonita sódica) e T₄ (ração sem aflatoxina com 0,5% de bentonita sódica), pela análise da regressão. Santa Maria, 1996.

CONCLUSÕES

Frente aos resultados encontrados, pode-se concluir que:

- é possível detectar a hepatotoxicidade provocada pela aflatoxina, através do monitoramento dos níveis das enzimas AST e GGT no soro das aves com faixa etária entre 21 e 42 dias; bem como pela avaliação dos níveis de LDH aos 21 dias de idade. O uso da bentonita sódica não altera estes resultados;

- a enzima ALT não é indicadora de lesões hepáticas provocadas pela aflatoxina;

- o uso da bentonita sódica na ração sem aflatoxina modifica o comportamento da enzima AST.

FONTES DE AQUISIÇÃO

a - Aliança Latina Comércio Exterior Ltda. Uruguiana, RS.

b - SAS USER'S GUIDE: Statistics - SAS Institute Inc.

c - Química Básica Ltda. Belo Horizonte, MG.

d - Milton Roy Company / Analytical Products Division Rochester, NY.

e - Cia. Equipadora de laboratórios modernos. Barueri, SP

f - Quick Lab. AD / DRAKE. Porto Alegre, RS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDIN, E.L. Aspectos patológicos das micotoxicoses em aves - diagnóstico diferencial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES. 1995, Curitiba, PR. *Anais... FACTA: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologias Avícolas*, 1995. 126 p. p. 109-114.

BRUGGERE-PICOUX, J., BRUGGERE, H., BASSET, I.; *et al.* Biochimie clinique en pathologie aviaire. Intéret et limites des dosages enzymatiques chez la poule. *Recueil Médecine Vétérinaire*, v. 163, p. 1091-1099, 1987.

DAFALLA, R.; YAGI, A., ADAM, S. Experimental aflatoxicosis in Hybro-type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. *Vet Hum Toxicol*, v. 29, n. 3, p. 222-226, 1987.

EDDS, G.T. Acute aflatoxicosis: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 162, n. 4, p.304-308, 1973.

FERNANDEZ, A., VERDE, M. T., GASCON, M. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin containing feed. *Avian Pathology*, v. 23, n. 1, p. 37-47, 1994.

JINDAL, N., MAHIPAL, N.K., MAHAJAN, N.K. Toxicity of aflatoxin B₁ in broiler chicks and its reduction by activated charcoal. *Research in Veterinary Science*, v. 56, p. 37-40, 1994.

KANEKO, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1989, 932 p.

KUBENA, L.F., HARVEY, R.B., HUFF, W.E. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T₂ toxin. *Poultry Science*, v. 69, p.1078-1086, 1990.

SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., STUBBLEFIELD., K.D. *et al.* Production of aflatoxin on rice. *Applied Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 425-428, 1966.

WEST S., WYATT, R. D., HAMILTON, P.B. Improved yield of aflatoxin by incremental increases of temperature. *Applied Microbiology*, v. 25, n. 6, p. 1018-1019, 1973.

Ciência Rural, v. 28, n. 4, 1998.