

**INFLUÊNCIA DA AFLATOXINA B₁ SOBRE A FAGOCITOSE
DE *Escherichia coli* EM GALINHAS HUBARD x HUBARD**

JOSÉ LUÍS DE CARVALHO

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE MESTRADO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

INFLUÊNCIA DA AFLATOXINA B₁ SOBRE A FAGOCITOSE
DE *Escherichia coli* EM GALINHAS HUBARD x HUBARD

JOSÉ LUÍS DE CARVALHO

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR
Dr. RONALD BASTOS FREIRE

Tese submetida como requisito parcial para a
obtenção do grau de **Magister Scientiae** em
Microbiologia Veterinária

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
AGOSTO DE 1998

TÍTULO DA TESE

**INFLUÊNCIA DA AFLATOXINA B₁ SOBRE A FAGOCITOSE
DE *Escherichia coli* EM GALINHAS HUBARD x HUBARD**

Por

JOSÉ LUÍS DE CARVALHO

TESE APROVADA EM 22 / 09/ 1998

RONALD BASTOS FREIRE

LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ

JOANA D'ARC HERSOG SOARES

**PASSARÁ O CÉU E A TERRA,
MAS AS MINHAS PALAVRAS
NÃO HÃO DE PASSAR**

LUCAS 21:33

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Ronald Bastos Freire**, pela orientação, apoio, estímulo e acima de tudo pela amizade apresentada durante o decorrer do trabalho.

Em especial, ao professor **Luiz Celso Hygino da Cruz**, pela paciência e dedicação completa que me confiou.

Às professoras **Lenir Cardozo Porfírio** e **Glória Maria Direito**, pelo auxílio e incentivo à realização deste trabalho.

À **Antonio Lúcio de Sousa** e demais amigos do laboratório de Imunologia / UFRRJ, pela convivência e amizade.

Ao **Centro de Micologia e Micotoxicologia**, que auxiliou no fornecimento de materiais e acolheu com carinho.

À **Deus** pela confiança e proteção

À **meus pais**, que sempre mostraram o caminho a seguir. Pelo eterno carinho e dedicação de verdadeiros amigos.

À **minha esposa Diana** e **meu filho Lucas**, pela compreensão, dedicação e carinho, nos momentos mais difíceis de minha jornada.

BIOGRAFIA

JOSÉ LUÍS DE CARVALHO, filho de Luiz de Carvalho e Neusa Malagueta de Carvalho, nasceu em 28 de abril de 1965 em Piracicaba, estado de São Paulo.

Ingressou na UNESP, no Curso de Zootecnia em 1984. Graduiu-se em Zootecnia em novembro de 1987. Ingressou-se na UFRRJ, no curso de Medicina Veterinária em 1989, graduando-se em Medicina Veterinária em março de 1994.

Em 1995, ingressou-se no Curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ.

Desenvolveu sua tese de mestrado, sob a orientação do Professor Dr Ronald Bastos Freire, a partir de fevereiro de 1995.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
LOCAL E INSTALAÇÕES.....	11
ANIMAIS.....	11
MICOTOXINA.....	12
SUSPENSÃO BACTERIANA.....	12
ANESTESIA GERAL.....	13
SOROTERAPIA.....	13
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	14
RESULTADOS.....	24
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

INDÍCE DE TABELAS

TABELA 1. Valores da DL50 de dose única de aflatoxina B₁ nas diferentes espécies (PATTERSON & ALLCROFT, 1970).....7

TABELA 2. Peso definido das aves da linhagem linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sangüíneo” de *Escherichia coli* K-12.....14

TABELA 3 - Diluições de sangue de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.....16

TABELA 4 – Diluições dos macerados de órgãos de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.....18

TABELA 5 – Peso definido das aves da linhagem linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sangüíneo” de *Escherichia coli* K-12, após prévia exposição à aflatoxina B₁.....19

TABELA 6 –Diluições de sangue de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , previamente expostas à aflatoxina B₁, segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.....21

TABELA 7 –Diluições de órgãos de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , previamente expostas à aflatoxina B₁, segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.....23

TABELA 8 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação pôr fagócitos sangüíneos de aves Hubard x Hubard, durante diferentes intervalos de tempo. Os resultados são a média de três repetições (p < 0,01).....25

TABELA 9 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação pôr fagócitos sangüíneos de aves Hubard x Hubard, previamente tratadas com 100 µg de aflatoxina B₁, durante diferentes intervalos de tempo. Os resultados são a média de três repetições (p < 0,01).....26

TABELA 10 - Peso definido dos órgãos das aves da linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sangüíneo” de *Escherichia coli* K-1227

TABELA 11 - Peso definido dos órgãos das aves da linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sanguíneo” de *Escherichia coli* K-12, previamente tratadas com 100 µg de aflatoxina B₁.....28

TABELA 12 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação por fagócitos sanguíneos das aves nos determinados órgãos e o percentual de recuperação dessas células no grupo não tratado ($p < 0,01$).....30

TABELA 13 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação por fagócitos sanguíneos das aves nos determinados órgãos e o percentual de recuperação dessas células nos órgãos das aves previamente tratadas com 100 µg aflatoxina B₁ duas horas antes ($p < 0,01$).....31

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Número de células viáveis de Escherichia coli k -12 após clarificação por fagócitos sanguíneos em diferentes intervalos de tempo.....29

FIGURA 2 - Percentual relativo de células bacterianas viáveis nos órgãos das aves previamente tratadas com aflatoxina B₁ comparadas com o grupo controle.....32

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o intuito de determinar a extensão dos prejuízos causados ao sistema imunitário pela aflatoxina. A modulação inflamatória foi avaliada através de ensaios *in vivo*, realizados em aves Hubard x Hubard, previamente expostos à aflatoxina (100 µg / g de peso vivo - 2 horas antes da infecção). Os experimentos *in vivo* basearam-se na eliminação (“clearance”) de ***Escherichia coli*** (amostra k-12 - FIOCRUZ), a partir de infecções experimentais, seguidas de sangria, hemocultivo e contagem do número de bactérias circulantes em diferentes intervalos de tempo. Observou-se uma acentuada diminuição do número de bactérias circulantes durante os 15 minutos de avaliação no grupo tratado. A partir de então, os animais intoxicados

mostraram-se incapazes de eliminar bactérias circulantes, evidenciando ter havido uma supressão da resposta inflamatória.

Nos animais intoxicados, foi dectado uma acentuada diminuição do número de bactérias nos órgãos em comparação com os não tratados . O percentual de bactérias foi maior no baço e fígado, com uma taxa de 91,9% e 7,6% respectivamente.

Os resultados mostraram a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade das aflatoxinas.

SUMMARY

The present thesis was concerned to immunoassays, carried out in order to evaluate the aflatoxin interference on the inflammatory mechanisms. Experiments were done by *in vivo* procedures. In the *in vivo* experiments, chickens (Hubard x Hubbard) received 100 µg / g de aflatoxin, 2 hours before infection with ***Escherichia coli***. The blood clearance of ***Escherichia coli***, was determined by haemoculture and quantification of the bacteria colonies in tryptose agar medium at different intervals (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 minutes). A significant decrease of the number of colonies recovering was observed at the 15 minutes period, of

aflatoxin-treated chickens. From there on, animals intoxicated with aflatoxin were not able to eliminate the circulating bacterias.

Aflatoxin-treated chickens, there were detectable a significant decrease of number of bacteria colonies on the organ, than in the control group.

The per cent of bacterias were found in the spleen and liver, with the rate of 91.9 % and 7.6 %, respectively.

The results have been shown, aflatoxin to be a micotoxin hepatotoxic and nephrotoxic.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos do gênero ***Aspergillus*** e das espécies ***Aspergillus flavus*** e ***Aspergillus parasiticus***.

Aspergillus flavus produz as aflatoxinas B₁ e B₂, enquanto que o ***Aspergillus parasiticus*** produz as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. (HESSELTINE et al., 1966).

As aflatoxinas ocorrem de modo natural, em nossos produtos agrícolas e hoje também encontradas em rações. Portanto, podemos encontrar as aflatoxicoses diretamente relacionadas com o consumo desses produtos citados acima pelo homem e animais.

Outro detalhe está nas condições climáticas de nosso país que favorece o desenvolvimento desses fungos, a produção de suas toxinas e a contaminação desses produtos agrícolas, que podem ocorrer já no seu processo

É do conhecimento geral que, o consumo direto e permanente desses produtos agrícolas e rações contaminadas pelas micotoxinas, induzem a processos agudos ou crônicos de aflatoxicoses, dependendo muito do tempo de exposição e da dose ingerida, o que constitui um sério problema em saúde pública e animal (SABINO, 1990).

Nas aves, as micotoxicoses tem, com consequência, efeitos não seletivos, que podem determinar a queda ou desaparecimento de mediadores imunitários, de modo inespecífico (FREIRE, 1995).

No entanto, há uma grande carência de dados sobre doses mínimas de micotoxinas, bem como de suas associações, passíveis de limitar a resposta imunitária nas aves.

Uma vez que os níveis de contaminação natural por micotoxinas são, normalmente baixos, um estudo relacionado a doses mínimas destes compostos e seu impacto sobre o sistema imunitário, são de extrema relevância. Embora a maioria dos estudos sugiram que micotoxinas possam afetar negativamente os mediadores liberados pelos macrófagos na resposta imune, assim como outras funções imunológicas importantes entre os quais destacam-se a produção de anticorpos, a liberação de complemento e a produção de interferon (SMITH & MOSS, 1985), são poucos os trabalhos científicos relacionados com os efeitos imunossupressores de micotoxinas, tal como ocorre no ambiente.

As doses de micotoxinas capazes de causar imunossupressão podem ser tão pequenas que a determinação de quantidades permissíveis de

ingestão para as diferentes micotoxinas, representa um considerável desafio a ser vencido.

Devido ao fato das aves mantidas sob confinamento estarem expostas a intoxicação contantes a micotoxinas, o aumento da susceptibilidade à bactérias e parasitos (QURESHI & HAGLER, 1992), assim como falhas vacinais tendem a manifestar-se frequentemente (DAHEL et al., 1990; HERSOG SOARES, 1994).

No Brasil, segundo maior exportador de carne de aves do mundo, estima-se perdas econômicas consideráveis em função de micotoxicoses aviárias (CRUZ, 1995).

As aflatoxinas, foram as primeiras micotoxinas reconhecidamente patogênicas para as aves. A aflatoxina B₁ quando associada à ochratoxina, por exemplo, podem causar danos tanto a nível de blastogênese linfocitária, como sobre os processos inflamatórios, podendo ainda, causar atrofia em órgãos linfóides, tais como a Bursa de Fabricius e o Timo (CAMPBELL et al., 1983)

De outro modo, galinhas tratadas com aflatoxinas B₁ na ração, apresentaram diminuição dos níveis séricos de IgA e IgG (GIAMBRONE et al., 1978).

Estima-se que a aflatoxina, após desdobramento metabólico, transforma-se em metabólito ativos que se ligam aos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ribonucléicos (RNA), prejudicando a atividade da enzima polimerase e inibindo a síntese de proteínas (CORRIER, 1991).

Considerando-se a importância das aflatoxicoses em aves e a escassez de informações no assunto, o objetivo principal do presente trabalho é avaliar a resposta imunológica em função da presença de agentes microbianos e aflatoxina B₁.

OBJETIVOS

O presente trabalho visou esclarecer alguns aspectos da ação imunomodulatória da aflatoxina. Os objetivos principais foram:

- Estabelecer os possíveis mecanismos de interação da aflatoxina B₁ com o sistema imunitário dos animais domésticos, utilizando aves Hubbard x Hubbard, como modelo experimental.
- Avaliar a interferência da aflatoxina B₁ sobre a resposta imunitária (resposta inflamatória) *in vivo*.
- Avaliar a interferência sobre os órgãos alvos principais da aflatoxina B₁ : Fígado e Rins.

REVISÃO DA LITERATURA

As aflatoxinas foram descobertas em 1960 e 1961, na Inglaterra, em granjas onde as aves (perus) consumiam ração contendo amendoim (torta), em decorrência à alta taxa de mortalidade em milhares de aves (SARGEANT et al., 1963).

Essa micotoxina, produzida por fungo do gênero *Aspergillus*, de maior importância e de ocorrência natural, em produtos contaminados são B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo que a aflatoxina B₁ e a G₁ apresentam-se com maior grau de toxidez. A intoxicação em indivíduos da mesma espécie animal, depende muito da idade, sexo, e o efeito tóxico das aflatoxinas para roedores e patos segundo WOGAN & EDWARDS, 1981, apresentam-se em ordem decrescente de efeitos tóxicos, a seqüência a seguir: B₁ > G₁ > B₂ > G₂.

Dentre as micotoxinas, a aflatoxina é uma substância que apresenta como alvo principal, o fígado, onde leva a um quadro de hemorragias e necrose. Também acompanha uma proliferação de ductos biliares e o acúmulo de gordura nos hepatócitos (BUSBY & WOGAN, 1981).

As várias espécies animais apresentam diferenciações no grau de sensibilidade à esta micotoxina. Esta susceptibilidade das diferentes espécies é confirmada por valores da DL50.

As aves apresentam uma alta resistência à aflatoxina em relação aos demais animais com é apresentado na tabela a seguir, segundo PATTERSON & ALLCROFT (1970).

TABELA 1 - Valores da DL50 de dose única de aflatoxina B₁ nas diferentes espécies (PATTERSON & ALLCROFT, 1970)

ESPÉCIE (Grau de Resistência)	DL 50 (mg Kg ⁻¹ peso vivo)
Patos	0,3 - 0,6
Leitão	0,6
Truta	0,8
Cão	1,0
Cobaio	1,4 - 2,0
Ovelha	2,0
Macaco	2,2
Rato	5,5 - 17,9
Galinha	6,3
Camundongo	9,0

Um dos efeitos mais importantes na intoxicação aviária pela aflatoxina é o efeito da imunossupressão. Aves submetidas a uma dieta contendo níveis baixos de aflatoxina não apresentaram resposta imunológica no processo de imunização contra agentes infecciosos. A imunossupressão é representada por lesões a nível do sistema retículo endotelial das aves, deixando as mesmas mais susceptíveis às infecções bacterianas, virais e até parasitárias (NEWBERNE, 1973)

MICHAEL et. al (1973), demonstraram que o sistema reticulo endotelial de galinhas é prejudicado durante a aflatoxicose. Há três importantes populações de fagócitos mononucleares que estão presentes na medula óssea, sangue e tecidos, isto é, os promonócitos, monócitos e macrófagos. Os promonócitos dividem-se na medula óssea para dar origem aos monócitos periféricos. Os monócitos vivem por poucos dias na corrente sangüínea e então migram pela parede capilar para penetrar nos tecidos, quando desenvolvem -se em macrófagos livres ou fixos. (BROWN, 1976; STEINMAN and COHN, 1974). O sistema de marcação utilizado por Michael et al. (1973), determinou o desaparecimento do carbono coloidal injetado no sangue e assim eles mediram essencialmente o efeito da aflatoxina sobre a capacidade fagocitária de macrófagos fixos.

RICHARD e THURSTON (1975) mostraram que macrófagos alveolares livres de coelhos, recebendo doses diárias de aflatoxinas tiveram reduzidas a sua capacidade fagocítica.

CHANG e HAMILTON (1978), utilizando *Enterobacter cloacae* "in

vitro”, tratados com diferentes doses de aflatoxinas, tiveram uma redução da capacidade fagocítica dos monócitos. As doses utilizadas foram: 0 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 ; 5,0 ; 10,0 $\mu\text{g/g}$ de aflatoxina. A média de fagocitose desses monócitos foi reduzida significativamente a partir de 1,25 $\mu\text{g/g}$ e doses de 5,0 e 10 $\mu\text{g/g}$ reduziram os parâmetros até 30 % do valor do controle.

Resíduos de aflatoxina e seus metabólitos em tecidos animais podem ser uma fonte de contaminação da alimentação humana (RODRICKS & STOLOFF, 1977).

As aves de corte são consideradas mais resistentes à toxicidade da aflatoxina do que outras espécies de aves (WILSON et al., 1980).

CHEN et al. (1984), trabalhando com rações para aves de corte contaminadas com aflatoxina B₁ e B₂, com níveis de 2057 e 1323 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ de ração respectivamente, num período de cinco semanas, mostrou que resíduos de aflatoxina (AFB₁ e AFB₂) foram encontrados nas aves tratadas.

Os mais altos níveis desses resíduos (0,26 e 0,19 $\mu\text{g/Kg}$ de AFB₁ e AFB₂ respectivamente) foram encontrados no pró-ventrículo das aves e logo abaixo desses valores, encontra-se o fígado. CHEN et al.(1984), comenta em seu trabalho, que esses níveis altos de resíduos de aflatoxina encontrados à nível de pró-ventrículo pode estar relacionado acidentalmente com a abertura do órgão através de bisturi e o fato deste órgão estar repleto de ração, onde ocorreu a contaminação pela aflatoxina. A soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, foi encontrada em maiores quantidades no fígado e rins.

FURTADO et AL. (1982), encontrou a soma de aflatoxinas B1, B2, M1 e M2, em maiores níveis, também no fígado e rins de porcos tratados com aflatoxina na ração.

CHANG & HAMILTON (1978), trabalharam com a avaliação da fagocitose de monócitos de aves prejudicada durante aflatoxicose. Foram utilizados concentrações diferentes de aflatoxinas na ração das aves : 0; 0,625 ; 1,25 : 2,5 : 5,0 e 10,0 $\mu\text{g} / \text{g}$ de ração. Em tubos siliconizados, foram adicionados 1 mL da suspensão bacteriana de *Enterobacter cloacae* em 5 mL do sangue das aves . Foi realizada a contagem total do número de leucócitos e a contagem diferencial do número de monócitos. Foi observado que níveis de 5 e 10,0 $\mu\text{g} / \text{g}$ diminuíram significativamente o percentual da atividade fagocítica de monócitos após 10 minutos de incubação. Um efeito significativo foi com 2,5 $\mu\text{g} / \text{g}$ com 30 minutos de incubação ou mais.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAIS

1- LOCAL E INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado no CENTRO de MICOLOGIA e MICOTOXICOLOGIA da UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL do RIO de JANEIRO.

2- ANIMAIS

Aves de corte, de linhagem definida (HUBARD X HUBARD) adultas, fornecidas pelo setor de Avicultura da PESAGRO - RJ em convênio com o INSTITUTO de ZOOTECNIA da UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL do RIO de JANEIRO.

Foram utilizadas seis aves adultas divididas em três repetições (aves) em cada etapa do experimento.

3- MICOTOXINA

Para o presente experimento, foi utilizado como micotoxina, a AFLATOXINA B₁, do laboratório SIGMA CHEMICAL CO., com peso de 1 mg, número A-6636; lote 115 H 4007

Esta micotoxina contendo 1 mg foi diluída em 4,0 mL de solução salina tamponada (PBS – 0,14 M de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH₂PO₄ e 8,1 mM de Na₂H PO₄; pH 7,4). Foram utilizados 100 µg de aflatoxina por Kg de peso vivo.

4- SUSPENSÃO BACTERIANA - *Escherichia coli*

A bactéria da família ENTEROBACTERIACEA *Escherichia coli* k- 12 padronizada pelo Centro de Pesquisa - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ.

Foi utilizada na Primeira Fase do experimento, uma suspensão bacteriana de *Escherichia coli* com turvação correspondente ao tubo 9 da escala de Mc Farland. Já na segunda etapa do experimento foi utilizado uma suspensão bacteriana com turvação correspondente ao tubo 5 da mesma escala de Mc Farland.

5 - ANESTESIA GERAL

Utilizou-se do anestésico geral de uso veterinário ZOLETIL 50 do laboratório VIRBAC, número de partida 005/96, data de fabricação dezembro/96, que possui em sua composição Cloridrato de Tiletamina; 125 mg e Cloridrato de Zolazepam; 125 mg, diluídos em 5 mL de água esterilizada.

A dosagem recomendada e utilizada para a espécie ***Gallus gallus*** é de 30 mg/Kg em aplicações intravenosa.

6- SOROTERAPIA

O soro utilizado para as aves mantidas em experimentação foi a solução MANITOL a 20 % do laboratório LABORMÉDICA - INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA lote 26456 de fabricação março/ 95, frasco de 250 mL, acoplado à equipo para soro e escalpe de número 25.

A via utilizada para a soroterapia foi a via intravenosa - veia jugular.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O modelo experimental foi realizado em duas etapas e em ambas foi feita inoculação experimental nas aves.

Na primeira etapa, utilizou-se de aves da linhagem Hubard x Hubard em 3 repetições, com peso definido (tabela 2).

Tabela 2– Peso definido das aves da linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sangüíneo” de *Escherichia coli* K-12.

	PESO DOS ANIMAIS
AVE 1	2 Kg e 200 g.
AVE 2	1 Kg e 950 g.
AVE 3	2 Kg e 100 g.
MÉDIA	2 Kg e 80 g.

As aves foram anestesiadas com aplicação intramuscular profunda (músculo peitoral da ave), onde a AVE 1 recebeu 66,0 mg, a AVE 2 recebeu 58,5 mg a AVE 3 recebeu 63,0 mg e a manutenção anestésica foi feita com um terço da dose recomendada, em aplicações intravenosas, via jugular.

Essas aves foram mantidas em soroterapia com soro MANITOL à 20 % durante todo o experimento para que fosse possível a retirada do sangue da ave nos seus respectivos tempos.

As aves foram inoculadas, pela via intravenosa, com 1 mL de uma suspensão bacteriana de *Escherichia coli* K-12, utilizando uma turvação equivalente ao tubo 9 da escala de Mc Farland. Essa turvação em valores absolutos, equívaleu num total de $5,11 \times 10^{10}$ UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por mL da suspensão bacteriana.

Utilizou-se metodologia descrita por Freire & Lopes (1995) De cada uma das aves, foi retirado 0,1 mL de sangue com uso de uma seringa plástica descartável estéril de 1 mL logo após os 5 minutos passados da inoculação bacteriana, tomando o cuidado para que o líquido que estava presente em todo o conduto do escalpe fosse retirado primeiro em outra seringa plástica descartável estéril de 1 mL e logo após a coleta do sangue, fosse repostado via intravenosa para que não houvesse perda do conteúdo bacteriano.

Essa quantidade de sangue (0,1 mL) foi misturada em 0,9 mL de uma solução salina estéril à 0.9 %. A partir desta diluição inicial (10^{-1}) foi preparado diluições decimais seriadas em cada tempo (tabela 3).

Tabela 3 - Diluições de sangue de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.

DILUIÇÕES										
TEMPO em min.	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
5			●	●	●	●	●			
10	●	●	●	●	●					
15	●	●	●	●						
30	●	●	●							
45	●	●								
60	●	●								
120	●									

● Diluição utilizada no determinado tempo.

Os tubos de vidro de meio de cultura Ágar Simples fundidos (líquido) foram envazados em uma placa de Petri estéril e logo em seguida adicionado a diluição desejada.

Essas placas de Petri com o meio já solidificado, eram marcadas de acordo com sua diluição decimal e logo a seguir colocadas em estufas e mantidas à 37 °C por um período de 24 horas.

Para cada diluição e para cada tempo após inoculação bacteriana (ver tabela 3) foi realizado o procedimento acima descrito em Capela com exaustor em funcionamento e próximo ao bico de Bünsen e após um período de 24 horas de cultivo foram realizadas contagens de colônia de *Escherichia coli* K-12.

Em conjunto com esse modelo experimental, ao final de cada 120 minutos, as aves foram sacrificadas e os quatro órgãos de interesse foram retirados, cuidadosamente, em local limpo e asséptico, próximo ao bico de Bunsen.

Os órgãos retirados, pesados e manipulados foram: o Rim, o Fígado, o Baço e o Pulmão.

Cada órgão citado acima, foi pesado e colocado em um gral, previamente esterilizado. Logo a seguir, retirou-se uma amostra com peso definido (de 1 grama do tecido), que foi macerada com pistilo previamente esterilizado, e suspensa em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9 %) estéril .

Desta suspensão, homogeneizou-se bem, filtrou-se as partículas maiores e, a partir desta diluição inicial, preparou-se diluições decimais seriadas em cada tempo (tabela 4).

Tabela 4 – Diluições dos macerados de órgãos de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.

DILUIÇÕES										
ÓRGÃOS	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
PULMÃO	●	●	●	●						
RIM	●	●	●	●						
BAÇO	●	●	●	●						
FÍGADO	●	●	●	●						

● Diluição utilizada no determinado tempo.

Já na segunda etapa, também utilizou-se de aves da linhagem Hubard x Hubard em 3 repetições, com peso definido (tabela 5).

Tabela 5 – Peso definido das aves da linhagem linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sangüíneo” de *Escherichia coli* K-12, após prévia exposição à aflatoxina B1.

	PESO DOS ANIMAIS
AVE 1	2 Kg e 300 g.
AVE 2	2 Kg e 100 g.
AVE 3	2 Kg e 100 g.
MÉDIA	1 Kg e 900 g.

Essas aves receberam, num período de duas horas antes de iniciar a inoculação bacteriana, uma solução intravenosa de aflatoxina na dosagem de 100 μg / Kg de peso vivo. A ave 1 recebeu 0,9 mL dessa solução, a ave 2 recebeu 0,8 mL e a ave 3 recebeu 0,7 mL.

Passadas duas horas do inoculo intravenoso de aflatoxina, as aves foram também anestesiadas com aplicação intramuscular profunda (músculo peitoral da ave). A ave 1 recebeu 69 mg, a ave 2 recebeu 63 mg e a ave 3 recebeu 57 mg. A manutenção anestésica foi feita com um terço da dose recomendada, em aplicações intravenosas, através da veia jugular.

Essas aves foram mantidas em soroterapia com soro MANITOL à 20 % durante todo o experimento para que fosse possível a retirada do sangue da ave nos seus respectivos tempos.

As aves foram inoculadas via intravenosa, com 1 mL de uma

suspensão bacteriana de *Escherichia coli* K-12, utilizando uma turvação que eqüivalia ao tubo 5 da escala de Mc Farland. Essa turvação em valores absolutos, eqüivaleu num total de $7,50 \times 10^9$ UFC (Unidade Formadora de Colônia) por mL da suspensão bacteriana.

De cada uma das aves, foi retirado 0,1 mL de sangue com uso de uma seringa plástica descartável estéril de 1 mL logo após os 5 minutos passados da inoculação bacteriana, tomando o cuidado para que o líquido que estava presente em todo o conduto do escalpe fosse retirado primeiro em outra seringa plástica descartável estéril de 1 mL e logo após a coleta do sangue, fosse repostado via intravenosa para que não houvesse perda do conteúdo bacteriano.

Essa quantidade de sangue (0,1 mL) foi misturada em 0,9 mL de uma solução salina estéril à 0.9 %. A partir desta diluição inicial (10^{-1}) foram preparadas diluições decimais seriadas em cada tempo de acordo com a tabela 6.

Tabela 6 –Diluições de sangue de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , previamente expostas à aflatoxina B1, segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.

DILUIÇÕES										
TEMPO em min.	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
5					●	●	●			
10				●	●					
15			●	●						
30		●	●							
45	●	●								
60	●	●								
120	●									

● Diluição utilizada no determinado tempo.

O material diluído foi adicionado em placa de Petri estéril, à qual verteu-se quantidade equivalente a 9 vezes, maior em volume, de meio de agar simples, previamente fundido em Banho-Maria (água fervente) e resfriado à temperatura de 56 °C . As placas de Petri, com o meio já solidificado, foram marcadas, de acordo com sua diluição decimal, e, logo a seguir, colocadas em estufa e mantidas à 37 °C por um período de 24 horas.

Todo procedimento microbiológico foi realizado dentro de uma Capela com exaustor em funcionamento e próximo ao bico de Bunsen.

Após 24 horas, foi feita a avaliação numérica (contagem) de colônias de *Escherichia coli* K-12 em todas as placas incubadas.

Ao final de cada 120 minutos, as aves foram sacrificadas e os quatro órgãos de interesse foram retirados, cuidadosamente, em local limpo e asséptico, próximo ao bico de Bunsen. Os órgãos dos animais, foram macerados, processados e diluídos de modo que o número de bactérias viáveis neles contidas pudesse ser medido.

Desta suspensão, homogeneizava-se bem, filtrava-se as partículas maiores e a partir desta diluição inicial era preparado diluições decimais seriadas em cada tempo (tabela7).

Tabela 7 –Diluições de órgãos de aves experimentalmente infectadas com suspensão de *Escherichia coli* K-12 , previamente expostas à aflatoxina B1, segundo o tempo, em minutos, após a inoculação bacteriana.

DILUIÇÕES										
ÓRGÃOS	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
PULMÃO	●	●	●	●						
RIM	●	●	●	●						
BAÇO	●	●	●	●						
FÍGADO	●	●	●	●						

- Diluição utilizada no determinado tempo.

RESULTADOS

Na avaliação da resposta inflamatória, os resultados foram obtidos através da comparação da média do número de colônias bacterianas de *Escherichia coli* K - 12 formadas a partir do plaqueamento do sangue das aves tratadas com aflatoxina B₁, em relação ao controle não tratado.

Nos primeiros 5 minutos, fica evidente no grupo não tratado, ter havido uma estimulação metabólica, com uma redução de células bacterianas de 99,9 %. Essa estimulação perdurou pelos 120 minutos totais do experimento (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação pôr fagócitos sangüíneos de aves Hubard x Hubard, durante diferentes intervalos de tempo. Os resultados são a média de três repetições ($p < 0,01$)

Tempo em minutos	Número de células bacterianas recuperadas	Percentual de células recuperadas
5	23.512.999	0,046
10	2.209.949	0,0043
15	487.467	0,0009
30	189.908	0,0004
45	6.922	0,00001
60	1.915	0,000004
120	540	0,000001

Já o grupo tratado, nos primeiros 5 minutos, apresentou uma redução de células bacterianas de 99,7%. (Tabela 9)

Tabela 9 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação pôr fagócitos sangüíneos de aves Hubard x Hubard, previamente tratadas com 100 µg de aflatoxina B₁, durante diferentes intervalos de tempo. Os resultados são a média de três repetições (p < 0,01).

Tempo em minutos	Número de células bacterianas recuperadas	Percentual de células recuperadas
5	19.466.666	0,26
10	2.866.667	0,038
15	1.033.333	0,014
30	516.667	0,007
45	433.333	0,006
60	203.333	0,003
120	146.500	0,002

Passado os 120 minutos do experimento, as aves foram sacrificadas e seus órgãos retirados como descrito anteriormente no material e métodos e pesados (tabela 10).

Tabela 10 - Peso definido dos órgãos das aves da linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sanguíneo” de *Escherichia coli* K-12

ÓRGÃOS	AVE 1	AVE 2	AVE 3
FÍGADO	24,60	49,25	52,32
BAÇO	3,62	2,84	3,50
RIM	3,59	4,11	17,90
PULMÃO	8,52	9,12	10,36

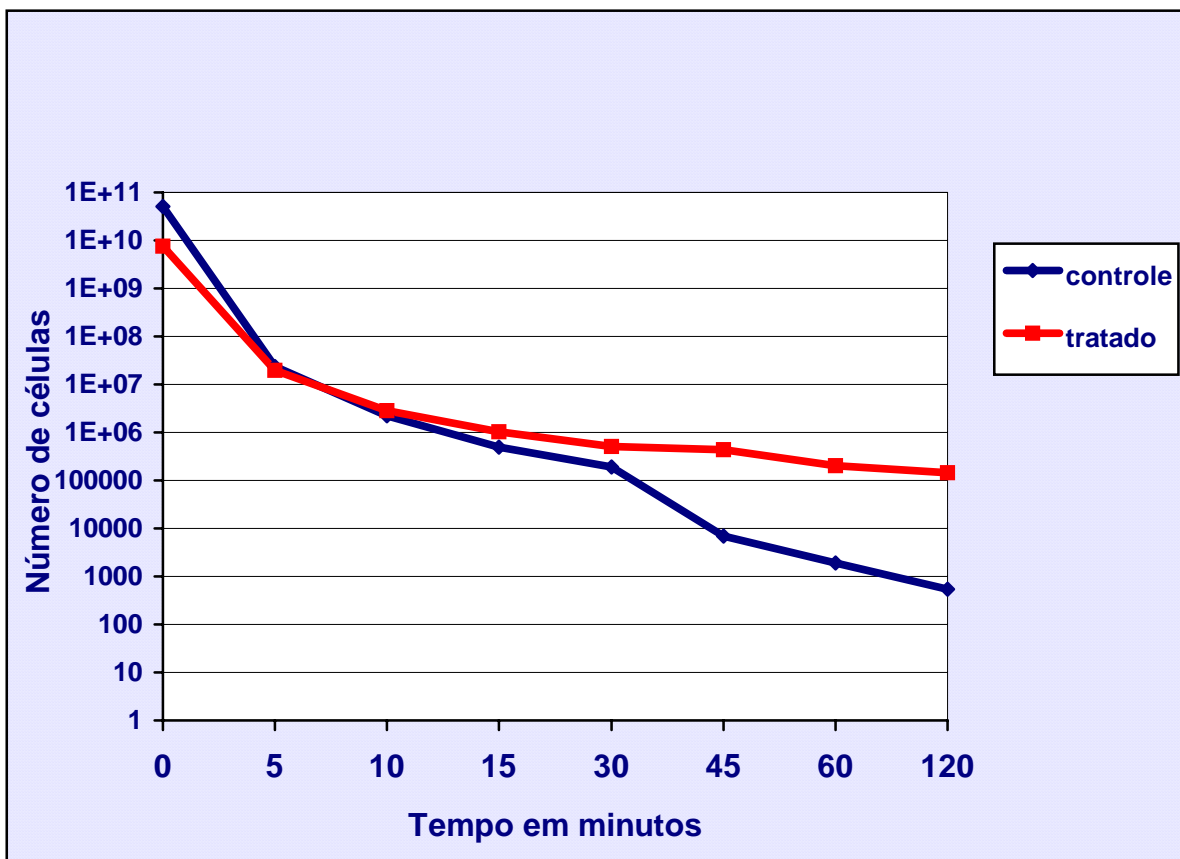
A metodologia também foi utilizada para as aves tratadas previamente com aflatoxina e seus órgãos também foram pesados (tabela 11).

Tabela 11 - Peso definido dos órgãos das aves da linhagem Hubard x Hubard utilizadas para experimentos de “clearance sanguíneo” de *Escherichia coli* K-12, previamente tratadas com 100 µg de aflatoxina B₁.

ÓRGÃOS	AVE 1	AVE 2	AVE 3
FÍGADO	45,05	53,50	104,43
BAÇO	3,17	3,54	5,28
RIM	11,89	17,85	25,82
PULMÃO	13,57	17,68	16,09

O número de células bacterianas de *Escherichia coli* K -12 recuperadas após a clarificação por fagócitos sanguíneos das aves, previamente tratadas com 100 µg de aflatoxina B1 foi comparado com o grupo controle (Figura1)

Figura 1 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* k -12 após clarificação por fagócitos sanguíneos em diferentes intervalos de tempo.



Como descrito em material e métodos, para os determinados órgãos: Fígado, Rins, Baço e Pulmão, também foi avaliada a resposta inflamatória e os resultados foram obtidos através da comparação da média do número de colônias bacterianas de *Escherichia coli* K - 1 formadas a partir do plaqueamento

da suspensão do masserado desses órgãos citados acima, das aves tratadas com aflatoxina B₁, em relação ao controle não tratado (Tabela 12 e 13)

Tabela 12 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação por fagócitos sanguíneos das aves nos determinados órgãos e o percentual de recuperação dessas células no grupo não tratado ($p < 0,01$)

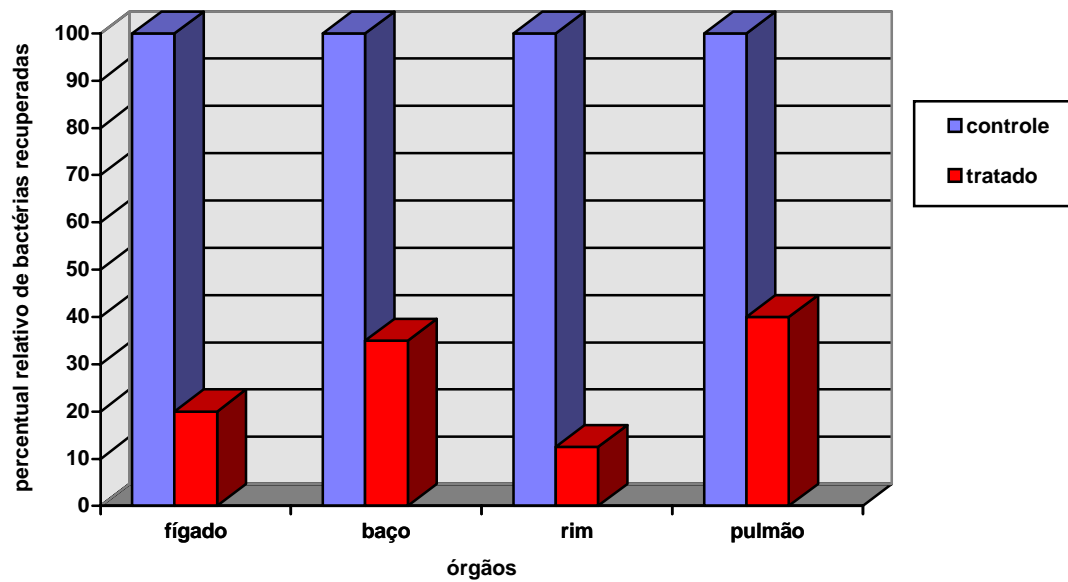
Órgão	Média do Peso (grama)	Nº de células bacterianas / grama do órgão	Nº de células bacterianas / peso total do órgão em gramas	% de células recuperadas nos órgãos
Fígado	42,10	606.500	25.533.650	0,05
Baço	3,32	3.560.000	11.819.200	0,02
Rim	8,53	47.303	403.495	0,0008
Pulmão	9,33	7.303	68.137	0,0001
Total	-	-	-	0,0709

Tabela 13 - Número de células viáveis de *Escherichia coli* K - 12 recuperadas após clarificação por fagócitos sanguíneos das aves nos determinados órgãos e o percentual de recuperação dessas células nos órgãos das aves previamente tratadas com 100 µg aflatoxina B₁ duas horas antes ($p < 0,01$)

Órgão	Média do Peso (grama)	Nº de células bacterianas / grama do órgão	Nº de células bacterianas / peso total do órgão em gramas	% de células recuperadas nos órgãos
Fígado	67,60	11.167	754.889	0,01
Baço	3,99	134.222	535.545	0,007
Rim	18,53	433	8.019	0,0001
Pulmão	15,80	200	3.160	0,00004
Total	-	-	-	0,017

Os resultados do percentual relativo de bactérias recuperadas nos órgãos das aves previamente tratadas com aflatoxina B₁ quando comparados com o percentual relativo de bactérias recuperadas nos órgãos das aves não tratadas é apresentado na Figura 2

Figura 2 - Percentual relativo de células bacterianas viáveis nos órgãos das aves previamente tratadas com aflatoxina B₁ comparadas com o grupo controle.



DISCUSSÃO

As micotoxinas, principalmente a aflatoxina, se ingeridas em quantidades moderadas, são capazes de provocar patologias, pois muitas vezes interferem na modulação da resposta imunitária determinando o aparecimento de surtos de doenças nas aves.

As fontes de imunossupressão podem estar associadas à fenômenos de duas modalidades principais: a de origem genética e oriundo da ação de fatores exógenos ao organismo. As micotoxinas enquadram-se na última modalidade, podendo, entretanto, atuar tanto nos ácidos nucléicos, como sobre as células e mediadores circulantes das aves.

Em ambos os casos, os efeitos são drásticos, determinando falhas genéticas e efeitos teratogênicos, além do comprometimento da qualidade e quantidade da resposta imune aos diferentes estímulos, aos quais as aves são constantemente expostas.

Os primeiros trabalhos científicos sobre a ação supressora de micotoxinas, são em sua maioria relacionados à intoxicação por Aflatoxinas.

A Aflatoxina, especialmente, devido a sua grande ocorrência em todo o território nacional e pela importância como atuante sobre o sistema imunitário das aves, foi escolhida como ferramenta do presente trabalho.

Foi comparativamente avaliada a capacidade de eliminação de bactérias, pelo sistema imunitário das aves Hubbard x Hubbard utilizadas no experimento, expostos à Aflatoxina, em relação ao controle não intoxicado.

A avaliação da resposta inflamatória foi realizada, em intervalos definidos, durante um período de duas horas. Observou-se, que tanto no grupo controle como no grupo tratado, houve um decréscimo significativo no número de células bacterianas *Escherichia coli* K -12 em todo o intervalo de tempo do experimento (duas horas) após clarificação por fagócitos sanguíneos da aves.

O grupo controle apresentou uma curva de decréscimo muito mais acentuada significativamente, quando comparado com o grupo tratado com aflatoxina, que logo após os 15 minutos, mostrou-se contante o número de células bacterianas presentes ainda na corrente sanguínea, sugerindo que as aves tratadas com aflatoxina sofreram uma supressão da resposta inflamatória, influenciando assim no processo de fagocitose(Tabelas 8 e 9) (Figura 1)

Após os 5 minutos da inoculação da suspensão bacteriana, no grupo controle, observamos um percentual de 0,05 % do número total de células bacterianas presentes na circulação sanguínea, ficando evidente que, avaliando a resposta inflamatória, podemos afirmar que houve uma estimulação metabólica,

com um percentual de fagocitose 99,9 % e no grupo tratado, nos primeiros 5 minutos a estimulação metabólica apresentou um percentual de fagocitose um pouco menor com valor de 99,7 % (Tabelas 8 e 9).

Os fagócitos circulantes são as células mais comumente associadas aos processos de liberação de mediadores solúveis, capazes de mobilizar a resposta de todo o organismo animal. Sua disfunção, pode determinar estados de imunossupressão variados (CORRIER, 1991; FREIRE, 1996; FREIRE, 1996A; FREIRE et al, 1996).

CRUZ et al (1996) detectaram supressão em esplenócitos, de camundongos albinos, que apresentaram diminuição na síntese de anticorpos, *in vitro*, após exposições de misturas de citrinina e aflatoxina B₁.

O efeito pode estar relacionado a uma ação tóxica aos níveis de membrana e síntese celular.

SOUZA (1996), trabalhando com camundongos albinos, avaliou a resposta inflamatória *in vivo* e *in vitro* em intervalos de tempo definido, durante um período de duas horas. Os animais foram inoculados com suspensão de ***Escherichia coli*** e expostos à citrinina na concentração de 10 µg / mL. Apresentaram nos primeiros 15 minutos, uma estimulação metabólica, com um percentual de fagocitose 85,4 % superior ao controle, até os 30 minutos após inoculação, quando detectou uma eliminação de 12,47 %. Por outro lado, aos 60 minutos pós-infecção, tanto os experimentos *in vivo* como *in vitro*, mostraram supressão total da clarificação antigênica.

CHANG & HAMILTON (1978) também observaram em estudos de fagocitose de monócitos em aflatoxicose que, o percentual de fagocitose foi diminuído significativamente quando utilizou-se de diferentes níveis de aflatoxina na ração de aves.

Os antígenos através de vasos linfáticos ou de vasos sanguíneos, atingem as células linfomielóides especializadas (macrófagos). Subpopulações de linfócitos, possuindo receptores apropriados, são ativadas quando reconhecem, na superfície dessas células “apresentadoras de antígenos”, o produto antigênico.

Quando o sistema fagocítico mononuclear sofre qualquer alteração, praticamente todas as respostas imunitárias são afetadas, uma vez que a ativação linfocitária é, quase que exclusivamente macrófago-dependente. A maior parte dos autores sugerem que as micotoxinas atuem primordialmente sobre os componentes mediados por macrófagos (CORRIER, 1991; FREIRE, 1996; FREIRE, 1996A; FREIRE et al., 1996).

Analisando o número de células viáveis de **Escherichia coli** K -12 nos órgãos do presente experimento, fica evidente uma diferença significativa entre o grupo de aves não tratadas (controle) com o grupo de aves tratadas com aflatoxina.

Houve uma recuperação de células bacterianas significativa, maior no grupo não tratado em relação ao grupo tratado. O percentual total de células recuperadas nos órgãos das aves não tratadas foi de 0,07 % enquanto que o

percentual do grupo tratado com aflatoxina foi de 0,02 aproximadamente (Tabelas 12 e 13).

Estes dados indicam que a aflatoxina diminuiu a capacidade fagocitária dos fagócitos sanguíneos, impedindo que os mesmos pudessem dirigir-se aos demais órgãos após a fagocitose das células bacterianas livres na corrente sanguínea. O que não ocorreu nos animais controle.

Tanto no grupo tratado com aflatoxina como no grupo controle, fica evidente que o baço é o órgão de eleição para onde os fagócitos dirigem-se após o processo de fagocitose sanguínea.

No grupo controle, analisando os dados dos quatro órgãos estudados, podemos afirmar que do total de células bacterianas viáveis recuperadas após o período de duas horas da inoculação bacteriana, 84,3 % encontrava-se no baço, 14,4% no fígado, 1,12% nos rins e 0,17 % encontrava-se nos pulmões. Comparando com o grupo controle, afirmamos que no grupo de aves expostas à aflatoxina, houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) nos percentuais, onde encontramos 91,9 % de bactérias no baço, 7,6 % no fígado, 0,29% nos rins e 0,13 % nos pulmões (Tabelas 12 e 13)

Analisando essas diferenças significativas ($p < 0,01$), podemos afirmar que o baço, no grupo tratado ficou com uma maior responsabilidade por tentar destruir as células bacterianas já que não foi possível contar com a colaboração dos demais órgãos, principalmente o fígado. Podemos mostrar através desses valores que a aflatoxina possui uma atividade hepatotóxica, impossibilitando o fígado de cumprir com o seu papel, correspondendo com a

conclusão de HAYES (1980) que mostra que as aflatoxinas são tóxicas, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. WILSON (1978), em estudos epidemiológicos, teve um indicativo de que as aflatoxinas possuem toxicidade aguda e podem ser hepatocarcinogênicas.

O trabalho mostrou, através do percentual relativo de bactérias recuperadas nos órgãos comparado com o grupo controle (considerando esse grupo 100 %) que, o fígado e os rins apresentaram os menores percentuais em relação aos demais órgãos em questão. Os percentuais apresentados foram: 20 % para o fígado e 12,5 % para os rins, provando a hepato e nefrotoxicidades da aflatoxina. O baço e pulmão apresentaram os percentuais de 35 e 40 % respectivamente (Figura 2).

Foi observado quanto aos aspectos macroscópicos, que o fígado das aves tratadas com aflatoxinas apresentavam-se com lesões hemorrágicas e com o tecido bastante friável.

Nos rins, observamos uma diferença quanto aos aspectos macroscópicos, entre o grupo tratado e o grupo não tratado, levando a pensar na nefrotoxicidade das aflatoxinas. Os rins apresentaram-se bastante congestionados.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- A aflatoxina dependendo da concentração assimilada pelo organismo, pode estimular receptores celulares, interferindo nos processos metabólicos de digestão e secreção de mediadores inflamatórios.

- As aflatoxinas reduzem o potencial fagocítico de macrófagos e polimorfonucleares.

- É uma micotoxina, com ação hepatotóxica e certa ação nefrotóxica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSBY Jr., W. F. & WOGAN, G. N. Aflatoxin. *In*: SHANK, R. C. **Mycotoxin and n-nitroso compounds: Environmental risks**. CRC Press, Florida. 1981. vol. II, 235 pág.

BROWN, E. M., Blood and bone marrow. Page 81 - 108. *In*: Dellman, H. D. & Brown, E. M. **Textbook of Veterinary Histology**. Lea & Febiger, Philadelphia, 1976

CAMPBELL, M. L. , JR.; MAY, J. D.; HUFF, W. E. & DOERR, J. A. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. **Poultry Science**, 62(11): 2138-2144, 1983.

CHANG, C. F & HAMILTON, P. B. Impairment of Phagocytosis in Chicken Monocytes during Aflatoxicosis. Department of Poultry Science and Department of Microbiology., USA. August 25, 1978.

CHEN, C.; PEARSON, A. M. ; COLEMAN, T. H.; GRAY, J. I.; PESTKA, J. J.; AUST, S. D. Tissue deposition and clearance of aflatoxin from broiler chickens fed a contaminated diet. Departments of Food Science and Human Nutrition, 22: 447-451, 1984.

CORRIER, D. E. Mycotoxicosis : mechanisms of immunosuppression. Veterinary Immunology and immunopathology, 30:73-87, 1991.

CRUZ, L. C. H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses : Reflexos na indústria avícola. **In: I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves.** p. 1-13, Curitiba - PR, 1995.

CRUZ, L. C. H. ; HERZOG-SOARES, J. D. A. & FREIRE, R. B. Can mycotoxins induce apoptosis ?. **In: IX Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phicotoxins.** PM104, p.239, Rome, 1996.

CRUZ, L. C. H. ; MARTORELLI, R. A. & FREIRE, R. B. In vitro antibodies production impairment by the association aflatoxin B₁ - citrinina. ***In: IX Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phicotoxins.*** PM105, p.240, Rome, 1996.

DAHEL, M. C. ; FRAYSSINET, L. & FRAYSSINET, C. Immunossuppressive effects of four thrichotecene mycotoxins. ***Food Adit. and Contam.*** 7: 594-596, 1990.

FREIRE, R. B. Micotoxinas e imunossupressão em aves. ***In: I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves.*** 115-125, Curitiba - PR, 1995.

FREIRE, R. B. & LOPES, C. W. Determination of macrophage activity in albino mice experimentally infected with ***Cystoisospora felis*** (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (Apicomplexa : Sarcocystidae). ***Brazil J. Vet. Parasitol.*** 4:25-28, 1995.

FREIRE, R.B.; SOUZA, C. C.; CRUZ, L.C.H. Humoral immunoresponse discontinuance caused by citrinin. ***In: IX Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phicotoxins.*** PM106, p.241, Rome, 1996.

FREIRE, R. B. Possibilidades e limites do diagnóstico imunológico das micotoxinas.

Cap. 10, p. 78-90 ; **In:** CRUZ, L. C. H. (ED) **Micotoxinas. Perspectiva Latino Americana.** 261 p., Editora Universidade Rural, 1996.

FREIRE, R. B. Micotoxinas e resposta imune. Cap. 17, p. 164-180. **In:** CRUZ, L. C.

H. (ED.) **Micotoxinas. Perspectiva Latino Americana.** vol. 1, 261 p., Editora Universidade Rural, 1996A.

FURTADO, R. M.; PEARSON, A. M.; HOGBERG, M. G. ; MILLER, E. R.; GRAY, J.

I. & AUST, S. D. (1982). Withdrawal time required for clearance of aflatoxins from pig tissues, **J. Agric. Fd. Chem.:** 30: 101.

GIAMBRONE, J. J. ; EWERT, D. L.; WYATT, R. D. ; and EIDSON, C. S., Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken.

Am. J. Vet. Res. 39: 305-308,1978.

HAYES A. W. Mycotoxins : A review of biological effects and their role in human

diseases. **Clin. Toxicol.** 17: 45,1980

HERZOG-SOARES, J. D. A. Efeito *in vitro* da citrinina sobre macrófagos peritoneais de galinhas doadoras da raça Leghorn. Tese de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 43 p., 1994.

HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O. L.; ELLIS, J. J. et al. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Bact. Rev.**,30(4):795-805, 1966

MICHAEL, G.Y.; THACSTON, P. & HAMILTON, P.B. Impairment of the reticuloendothelial system of chickens during aflatoxicosis. **Poultry Science**, 52: 206-207, 1973.

NEWBERNE, P. M. Chronic aflatoxicosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 163(11):1262-1267, 1973.

PATTERSON, D. S. P. & ALLCROFT, R. F. Cosmet Toxicol., v.8, p.43, 1970. **In:** Betina, V. “**Micotoxins Production, Isolation, Separation and Purification**”. Elsevier, Amsterdam. 8:111, 1984

QURESHI, M. A. & HAGLER, W. M. Effect of Fumonisin-B₁ exposure on chicken macrophage functions in vitro. **Poultry Science**, 52:104-112, 1992.

RICHARD, J. L., THURSTON, J. R. and PIER, A. C., Mycotoxin-induced alterations of immunity. *In*: Schlessinger, D. Microbiology - 1975, Amer. Soc. Microbiol., Washington, DC. 388 - 396, 1975.

RODRICKS J.V. & STOLOFF L. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of feed producing animals. *In*: **Mycotoxins in Human and Animal Health**. J. V. Rodricks, C.W.Hesseltine & M.A. Mehlman (ed) p.67. Pathotox. Inc., Park Forest South, IL. 1977.

SABINO, M. Aflatoxinas B₁, M₁ e Aflatoxicol: Extração e Caracterização em tecidos e urina. Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 113 p. 1990.

SARGEANT, K.; CARNAGHAN, R. B. A. & ALLCROFT, R. Chemistry and origin. Chem. Ind., v.12, p.53-55, 1963

SMITH, J. E. & MOSS, M. O. Mycotoxins : Formation, Analysis and Significance.
Bohn Wiley & Sons Ltd. U. K., 147 p., 1985

SOUSA, M. M. S. Estimulação de blastogênese in vitro e supressão da resposta
inflamatória em camundongos albinos experimentalmente expostos à
citrinina. UFRRJ. Tese de Mestrado -56 p. 1996.

STEINMAN, R. M., & COHN, Z. A.,. The metabolism and physiology of the
mononuclear phagocytes. Page 449-510 *In*: Zweifach, B. W., Grant, L
& McCluskey, R. T. (Ed.). **The Inflammatory Process**, 2^a ed. Vol. 1.
Academic Press, New York, 1974

WILSON, B. J. Hazards of mycotoxins to public health. **J. Fd. Prot.** 41: 375, 1978.

WILSON, C.B.; TSAI, V. & REMINGTON, J.S. Failure to trigger the oxidative burst
of normal macrophages. Possible mechanism for survival of intracellular
pathogens, **J. Exp. Med.**, 151: 328-346, 1980.

WOGAN, G.N & EDWARDS, G. S. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. **Cancer Res.**31:1936, 1971. ***In:*** Shank, R, G. **Mycotoxins and n-nitroso compounds: environmental risks.**: CRC Press, Florida. vol II, 235 p,1981

