

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Avaliação da capacidade protetora da piperina (extraída a partir das sementes de *Piper nigrum* L.), sobre parâmetros relacionados ao sistema imune de frangos de corte intoxicados experimentalmente por aflatoxina B₁.

Isabela Silva de Castro

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETORA DA PIPERINA
(EXTRAÍDA A PARTIR DAS SEMENTES DE *Piper nigrum* L.), SOBRE
PARÂMETROS RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNE DE FRANGOS
DE CORTE INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE POR
AFLATOXINA B₁.

ISABELA SILVA DE CASTRO

Sob a Orientação da Professora
Maria das Graças Miranda Danelli

e Co-orientação do Professor
Carlos Mazur

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

574.2326

C355a

T

Castro, Isabela Silva de, 1984-

Avaliação da capacidade protetora da Piperina (extraída a partir das sementes de *Piper nigrum* L.), sobre parâmetros relacionados ao sistema imune de frangos de corte intoxicados experimentalmente por Aflatoxina B₁. / Isabela Silva de Castro - 2010.

43 f.: il.

Orientador: Maria das Graças Miranda Danelli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 35-43.

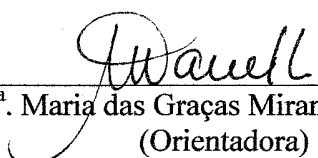
1. Aflatoxina - Teses. 2. Frango de Corte - Microbiologia - Teses. 3. Micotoxinas - Teses. I. Danelli, Maria das Graças Miranda, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

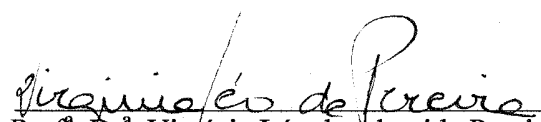
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

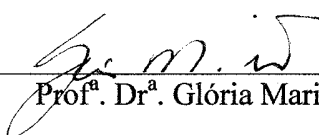
ISABELA SILVA DE CASTRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/02/2010.


Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Miranda Danelli. UFRRJ
(Orientadora)


Prof.^a Dr.^a Virginia Léo de Almeida Pereira. UFF


Prof.^a Dr.^a Glória Maria Direito. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Maria das Graças Miranda Danelli, e ao meu co-orientador Carlos Mazur pelo incentivo, paciência, oportunidade e confiança.

À minha mãe, Marilu Silva de Castro por todo apoio, compreensão e por tudo que sou hoje.

À Diego de Mello Conde de Brito por todo apoio e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Biologia animal, da Área de Histologia e Embriologia, da UFRRJ, Armando Sales, Rosa Maria Marcos Mendes, Aparecida Alves do Nascimento, e à técnica de laboratório Ilza Lucas C. Meireles pela atenção e colaboração, sem os quais não poderia ter concluído os objetivos traçados neste estudo.

À professora Marilene de Farias Brito Queiroz, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública/ UFRRJ, pela sua atenção.

À professora Gloria Maria Direito pelo auxílio na produção da toxina utilizada.

Ao professor Marco Edílson Freire de Lima pela produção e fornecimento da piperina.

Ao Departamento de Produção Animal do Instituto de Zootecnia/ UFRRJ, em especial ao Setor de Avicultura, principalmente à professora Cristina Amorim Ribeiro de Lima pela colaboração no manejo e manutenção das aves.

Em especial à minha amiga Verônica da Silva Cardoso, por todo apoio, ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis.

À todos os integrantes do Laboratório de Imunologia e Víruses, que de alguma forma participaram da execução do projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado nos dois primeiros semestres e a FAPERJ pela concessão da bolsa nos dois últimos.

Enfim, a todos que de alguma forma cooperaram para conclusão desta etapa da minha vida profissional.

RESUMO

CASTRO, Isabela Silva de. **Avaliação da capacidade protetora da piperina (extraída a partir das sementes de *Piper nigrum* L.), sobre parâmetros relacionados ao sistema imune de frangos de corte intoxicados experimentalmente por aflatoxina B₁**. 2010. 43p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

As aflatoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário de fungos, frequentemente encontradas em grãos e rações. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é o tipo produzido em maior quantidade e que possui maior potencial tóxico. Entre os efeitos causados pela intoxicação em frangos de corte e poedeiras podem-se citar a diminuição da produtividade devido à diminuição de ganho de peso e da postura de ovos, lesões no fígado com alterações nos níveis de enzimas hepáticas, danos cromossômicos, carcinogênese e imunossupressão levando ao aumento da suscetibilidade às infecções e diminuição da resposta vacinal. A piperina, por outro lado, é um produto natural extraído da pimenta do reino (*Piper nigrum*), que possui propriedade citoprotetora, demonstrada pela sua capacidade antioxidativa e antiapoptótica, além de possuir efeito imunoprotetor frente a vários produtos imunotóxicos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo contribuir para o conhecimento da capacidade imunoprotetora da piperina adicionada à ração, analisando possíveis efeitos sobre parâmetros imunológicos em frangos de corte (*Gallus gallus*) intoxicados por AFB₁. Para realizar o estudo 60 frangos de corte machos, com 7 dias de idade, foram divididos em 4 grupos (n=15): grupo controle (óleo de soja), grupo AFB₁ (0,5 mg AFB₁/kg de peso corporal, via oral), grupo piperina (60 ppm misturada à ração) e grupo piperina + AFB₁ (60ppm piperina e 0,5mg AFB₁/kg peso corporal). Todos os grupos foram vacinados contra o vírus da doença de Newcastle (NDV) aos 9 e 28 dias de idade. Inicialmente, os grupos controle e AFB₁ foram examinados visando a determinação da capacidade de intoxicação das aves pela concentração de AFB₁ (0,5 mg/Kg) empregada no estudo, através da necropsia e pesagem do fígado, dosagem das enzimas AST e GGT, análise do efeito citotóxico sobre a medula óssea (frequência de PCE) e pesquisa de micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico. Uma vez determinado o efeito tóxico da AFB₁ nos frangos de corte, avaliou-se a capacidade da piperina suprimir os efeitos imunotóxicos dessa micotoxina, através da necropsia, pesagem e análise histopatológica dos órgãos linfóides (timo, bursa de Fabrício e baço), contagem total e diferencial de leucócitos e análise da resposta vacinal para o NDV. A concentração de AFB₁ empregada no estudo foi capaz de promover intoxicação nos frangos de corte, demonstrada pela diminuição do ganho de peso, alterações hepáticas (aumento de peso e alteração do aspecto macroscópico do fígado, aumento das enzimas hepáticas AST e GGT), comprometimento da medula óssea (diminuição da frequência de PCE) e aumento da presença de micronúcleos em eritrócitos sanguíneos, além ter sido capaz de promover danos ao timo das aves, demonstrada pela diminuição do peso do órgão, bem como, alterações macro e microscópicas. O efeito tóxico sobre a medula óssea e timo promoveu evidente leucopenia, com diminuição significativa dos linfócitos e heterófilos circulantes. Os efeitos tóxicos da AFB₁ sobre a resposta vacinal não foi tão evidente quanto para os outros parâmetros estudados relacionados ao sistema imune. A administração de piperina à ração das aves foi capaz de impedir os efeitos imunotóxicos da AFB₁ em todos os aspectos avaliados nesse estudo.

Palavras-chave: Piperina, Aflatoxina B₁, Frangos de corte.

ABSTRACT

CASTRO, Isabela Silva de. **Evaluation of piperine (extracted from *Piper nigrum* L. seeds) protective availability under organs and cells related with immune system of broiler chickens experimentally intoxicated with aflatoxin B₁**. 2010. 43p Dissertation (Master Science in Veterinary Science, Animal health). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Aflatoxins are toxic products from molds secondary metabolism, usually found in grains and feed. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the type produced in major quantity and possesses the greatest toxic potential. Among the effects produced in layer and broiler chickens intoxication, can be mentioned, the productivity decrease due to reduction in body weight gain and laying eggs reduction, liver lesions with alterations in hepatic enzymes levels, chromosomes damage, carcinogenesis and immunosuppression leading to increase in susceptibility to infections and vaccinal response decrease. In the other hand, piperine is a natural product extracted from black pepper (*Piper nigrum* L.) and own citoprotective properties, showed by its antioxidative and antiapoptotic capacity, moreover it possesses immunoprotective effects against many immunotoxic products. Therefore, this research aimed to contribute to the knowledge of immunoprotective ability of piperine added in feed, assessing possible effects under immunological parameters in broiler chickens intoxicated by AFB₁. To perform the study 60 male broiler chickens, 7 days old, were divided into four groups (n=15), control group (soya oil), AFB₁ group (0,5 mg AFB₁/kg of body weight, orally), piperine group (60ppm on feed) and piperine-AFB₁ group (piperine 60ppm and 0,5mg/kg of body weight). All groups were vaccinated against Newcastle disease virus at 9 and 28 days old. Initially, the control and AFB₁ groups were examined aiming the determination of AFB₁ concentration (0,5 mg /kg) ability in broiler chickens intoxication, by the liver necropsy and weighing, AST and GGT enzymes dosage, citotoxic effects assessment on bone marrow (PCE frequency), micronucleus research in red blood cells. Once the toxic effect of AFB₁ as determined in broiler chickens, were evaluated the piperine ability in suppress the immunotoxic effects of AFB₁, by necropsy, weighing and histopathological analyses of the lymphoid organs (thymus, bursa of Fabricius and spleen), total and differential circulating leukocytes counts, and vaccinal response to Newcastle disease virus. AFB₁ concentration used in this study was able to promote broiler chicken intoxication, showed by the decrease in body weight gain, hepatic alterations, (weight increase and liver aspect alterations and AST and GGT hepatic enzymes), bone marrow damage (reduce in PCE frequency) and increase in micronucleus presence in red blood cell. This concentration of AFB₁ was able to promote damages in birds thymus, showed by the reduce in the organ weight, and macroscopic and microscopic alterations. The toxic effect on bone marrow and thymus promoted marcable leucopeny, with significant reduce in circulating lymphocytes and heterophils. The toxic effects of AFB₁ on vaccinal response were not evident as much as other immune parameters studied. The administration of piperine in chicks feed was able to avoid the AFB₁ immunotoxic effects in all aspects evaluated in this study.

Keywords: Piperine, Aflatoxin B₁, Broiler Chicken.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
	2.1 Micotoxinas	3
	2.2 Aflatoxinas	3
	2.3 Aflatoxina B ₁	4
	2.4 Aflatoxicose em Aves	6
	2.5 Combate à aflatoxicose	7
	2.6 Piperina	8
3	MATERIAIS E MÉTODOS	10
	3.1 Aves e Manejo	10
	3.2 Obtenção da Piperina e Incorporação na Ração	10
	3.3 Obtenção e Administração de AFB ₁ em Frangos de Corte	11
	3.4 Protocolo de Vacinação	12
	3.5 Delineamento Experimental	12
	3.6 Verificação da Intoxicação pela AFB ₁	13
	3.6.1 Avaliação das alterações hepáticas	14
	3.6.2 Frequência de PCE e teste do micronúcleo	14
	3.7 Avaliação do Efeito Imunoprotetor da Piperina	14
	3.7.1 Avaliação macroscópica e Pesagem dos órgãos linfóides	14
	3.7.2 Análise histopatológica dos órgãos linfóides	15
	3.7.3 Leucometria total e diferencial	15
	3.7.4 Quantificação de anticorpos específicos para o vírus da doença de Newcastle por ELISA	16
	3.7.5 Titulação de anticorpos protetores para o vírus da doença de Newcastle pela técnica de Inibição de Hemaglutinação (HI)	16

3.8	Análise Estatística	16
4	RESULTADOS	17
4.1	Determinação dos efeitos tóxicos da concentração de AFB1 empregada no estudo	17
4.2	Avaliação do Efeito Imunoprotetor da Piperina	20
4.2.1	Avaliação macroscópica e Pesagem dos órgãos linfóides	20
4.2.2	Histopatologia dos órgãos linfóides	22
4.2.3	Leucometria total e diferencial	25
4.2.4	Pesquisa de anticorpos específicos para o vírus da doença de Newcastle	27
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	34
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que entram na dieta de animais e humanos através da contaminação direta ou indireta de grãos e cereais. Uma vez ingerida, as micotoxinas são de difícil detecção, induzindo, em muitos casos, síndromes moderadas que são facilmente confundíveis com doenças causadas por outros microrganismos.

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Dentre os tipos já descritos, as principais são a AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, sendo a primeira encontrada em maiores concentrações e com maior potencial tóxico. Em saúde animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido.

Na avicultura, as micotoxinas podem levar a condenação de todo o plantel de frangos de corte e de postura contaminados, significando um enorme prejuízo ao produtor. Os níveis de aflatoxinas em produtos vegetais e rações no Brasil têm sido considerados elevados pelos integrantes do Programa Nacional de Micotoxinas. Mesmo em baixos níveis, as aflatoxinas estão relacionadas com a diminuição da produtividade em aves aparentemente saudáveis, levando à diminuição de ganho de peso e da postura de ovos, além de causar efeito genotóxico, carcinogênico, lesões no fígado induzindo alterações nos níveis de enzimas hepáticas e efeito imunossupressor observado pelo aumento da suscetibilidade às infecções e diminuição da resposta vacinal.

Na última década, dada sua importância, diversos pesquisadores têm se debruçado sobre o estudo de produtos (adição de adsorventes ou de substâncias antioxidantes à ração) e formas de inativação (radiação, elevação da temperatura) de aflatoxinas, na tentativa de diminuir seus efeitos tóxicos.

A piperina é uma amida natural extraída da pimenta-do-reino, sendo descrita na literatura como um potente quimioprotetor contra diversos produtos tóxicos, como benzo(a)pireno, cádmio, 1-metil-4-fenil piridinium e, até mesmo sobre AFB₁, demonstrando resultados positivos contra seus efeitos citotóxicos e genotóxicos sobre hepatócitos de ratos, *in vitro*.

Diversos aspectos contribuem para o interesse sobre o potencial da piperina como aditivo natural no setor avícola como: (i) a possibilidade de seu isolamento em grande quantidade, (ii) possuir baixo custo de produção, (iii) não produzir acúmulo de resíduos detectáveis no organismo animal, (iv) além de sua propriedade citoprotetora, demonstrando, claramente, sua capacidade antioxidativa, antiapoptótica e, de restauração de células com respostas mitogênicas proliferativas ou alterações fenotípicas, sugerindo seu uso preventivo ou terapêutico em condições de comprometimento do sistema imunológico.

Assim, devido à capacidade da AFB₁ promover efeito supressor sobre o sistema imune de aves, levando a importantes perdas econômicas, e o evidente efeito protetor da piperina sobre o efeito tóxico da AFB₁ em ratos, identificamos a necessidade de avaliar o efeito imunoprotetor da piperina misturada à ração de frangos de corte intoxicados experimentalmente com AFB₁, objetivando gerar informações que permitam o desenvolvimento de medidas preventivas para eventos que levem ao comprometimento do sistema de defesa do organismo. Portanto, segundo os argumentos dissertados acima, a hipótese defendida neste trabalho, é de que a piperina seja capaz de amenizar ou mesmo impedir os efeitos imunotóxicos causados pela AFB₁.

Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi contribuir para o conhecimento da capacidade protetora da piperina adicionada à ração, analisando possíveis efeitos sobre parâmetros imunológicos em frangos de corte (*Gallus gallus*). Como objetivos específicos pretendeu-se:

(i) Determinar os efeitos citotóxicos e genotóxico da concentração de AFB₁ empregada no estudo.

(ii) Avaliar a ação da piperina sobre o sistema imunológico e sua capacidade protetora, evidenciando os aspectos macroscópicos e microscópicos dos órgãos linfóides (timo, bursa de Fabrício e baço).

(iii) Avaliar o efeito da piperina na ação supressora da AFB₁ sobre os linfócitos circulantes.

(iv) Avaliar o efeito da piperina sobre a resposta vacinal dos frangos de corte intoxicados por AFB₁ e imunizados com vacina para o vírus da doença de Newcastle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micotoxinas

As micotoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário de fungos filamentosos que, quando presentes em alimentos destinados à alimentação humana ou animal, podem causar danos à saúde. Assim, as micotoxinas tornam-se, além de um problema de saúde pública, uma preocupação no âmbito econômico devido aos prejuízos causados à agricultura, à produção animal e de seus derivados (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Historicamente, são reconhecidos casos graves de micotoxicoses como, por exemplo, a ocorrência de uma doença letal na Rússia, durante a segunda guerra mundial, denominada “Aleucia tóxica alimentar”. Essa doença, que afetou humanos, foi relacionada a uma manifestação tóxica de fungos contaminantes de grãos, sendo mais tarde atribuída à toxina T-2, produzida pelo fungo *Fusarium sporothrichioides* (SZCZECH, 1978).

No entanto, foi após o episódio ocorrido na década de 60, no Reino Unido, com a morte de milhares de aves domésticas (perus, frangos e patos), que a importância dessas substâncias foi reconhecida. A doença ficou conhecida como “Doença X dos perus”, e posteriormente, descobriu-se que a morte de tais animais estava relacionada à presença de fungos toxigênicos, principalmente do *Aspergillus flavus*, na farinha de amendoim que era incorporada à ração. A partir deste acontecimento, foi descoberta uma das micotoxinas mais estudadas atualmente, a aflatoxina (SPENSLEY, 1963).

2.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas principalmente por fungos do gênero *Aspergillus*, embora nem todos sejam produtores. Entretanto, são os *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus* as espécies que mais preocupam tanto por serem comuns, quanto por produzirem aflatoxinas em produtos agrícolas com destino ao consumo humano e animal. Segundo Probst et al. (2007) e Azziz-Baumgartner et al. (2005), o *A. flavus* foi o responsável pela contaminação de plantações de milho, no Quênia em 2004, que resultou em um surto de aflatoxicose aguda em humanos, com 317 casos relatados, dentre os quais 124 fatais.

Além da cultura de milho, tais fungos são facilmente encontrados em amendoins e derivados (SABINO et al., 1999), em sementes de algodão (GOYNES; LEE, 1989), amêndoas, pistache e nozes (BAYMAN et al., 2002).

Os primeiros tipos de aflatoxinas isolados foram a AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ (**Figura 1**), sendo suas denominações relacionadas à cor da fluorescência que emitem quando excitadas por luz ultravioleta (B-blue; G-green). A AFB₁ é o tipo isolado em maiores quantidades, seguido pela AFG₁, AFB₂, AFG₂. A ordem de citotoxicidade aguda e crônica é: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂, (MCLEAN; DUTTON, 1995). Deste modo, observa-se que a AFB₁ além de ser encontrada em maiores quantidades, também é a que possui maior potencial tóxico sendo portanto, a de maior destaque.

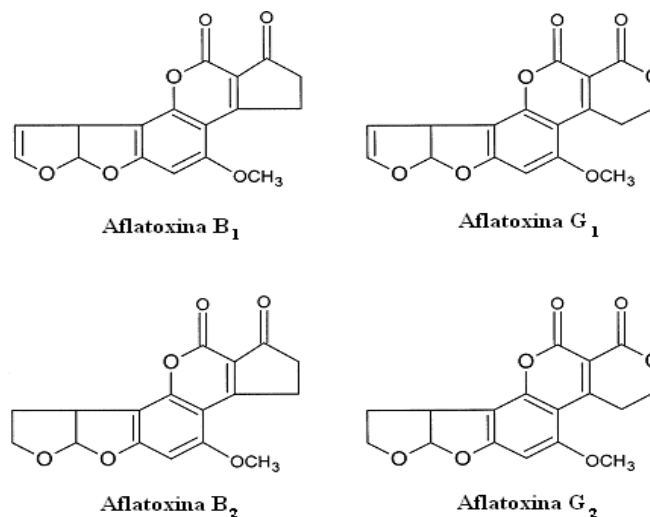


Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

2.3 Aflatoxina B₁

Existem diversos estudos em relação aos efeitos da AFB₁ sobre o organismo, como por exemplo, efeito mutagênico e carcinogênico, sendo associada ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em humanos (WILD; MONTESANO, 2009). Além disso, pode-se destacar também, efeitos teratogênicos, como descritos por Wangikar et al. (2005) que demonstraram alterações patomorfológicas em fetos de coelhos provenientes de mães intoxicadas.

Segundo Cuccioloni et al. (2009), estudos *in vitro*, demonstram ainda que este composto pode agir como inibidor competitivo de proteases de serina, como a trombina, tripsina e elastase. Essas enzimas estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos e respostas celulares como digestão, coagulação e a resposta inflamatória. Da mesma forma, Meissonnier et al. (2008) sugerem que a ingestão experimental de AFB₁ por suínos, acarreta uma diminuição da imunidade celular, que poderia diminuir a resposta a protocolos vacinais e aumentar a susceptibilidade a infecções.

Apesar da AFB₁ ser considerada, dentre as aflatoxinas, a de maior potencial tóxico, é seu metabolismo que a potencializa. Ao ser ingerida, a AFB₁ é absorvida pelo trato gastrointestinal, e ao chegar à corrente sanguínea se liga de forma reversível à albumina, e em menor escala, a outras proteínas. Tanto as formas ligadas quanto as não ligadas espalham-se pelo organismo, principalmente através do fígado. Neste órgão, a AFB₁ sofre biotransformação pela ação do sistema microsomal hepático (WYATT, 1991).

A biotransformação é a alteração química sofrida por xenobióticos no organismo, normalmente sob ação de enzimas específicas ou inespecíficas. Portanto, nesse processo os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das drogas originais, com características mais hidrofílicas, com o objetivo de facilitar a excreção pelo organismo (MEYER, 1996). Contudo, nem sempre as drogas são inativadas, e assim, alguns metabólitos acabam apresentando atividade aumentada ou propriedades tóxicas, dentre elas, no caso da AFB₁, a mutagenicidade, a teratogenicidade, imunossupressão e a carcinogenicidade.

O citocromo P450, uma enzima do sistema microsossomal hepático, parece exercer um papel fundamental na biotransformação da AFB₁. Através de epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula desta toxina, dá-se origem ao produto AFB₁-8,9-epóxido (GALLAGHER et al., 1994). Este produto é capaz de se ligar covalentemente a moléculas de DNA, RNA e proteínas, gerando aductos de DNA, caracterizando seu potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico (SOTOMAYOR et al., 2003). O efeito genotóxico gerado pela biotransformação da AFB₁ pôde ser demonstrado por Reen et al. (1997) que avaliaram a presença de micronúcleos em células de ramsters geneticamente modificadas (V79 MZr2B1) tratadas, *in vitro*, com AFB₁ e com um composto, a piperina, capaz de inibir o citocromo P450. Neste estudo Reen et al. (1997) observaram que a biotransformação da AFB₁ foi capaz de aumentar a produção de micronúcleos, entretanto, na presença de piperina essa produção diminuía significativamente, demonstrando que a AFB₁ necessita ser metabolizada para gerar tal efeito genotóxico e, que a piperina foi capaz de inibir o citocromo responsável por tal biotransformação.

O estudo feito por Reen et al. (1997) além de demonstrar a necessidade de biotransformação da AFB₁, para geração de seus efeitos, também mostra a eficiência da utilização do teste do micronúcleo para detecção de dano genético. Há duas décadas, o uso do teste de micronúcleos (MN) na investigação dos danos cromossômicos tem recebido considerável atenção (STICH et al., 1983), pois micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos que não foram incorporados ao núcleo principal na mitose e conseqüentemente aparecem apenas em células que sofreram divisão celular (FENECH; MORLEY, 1985). Portanto, sua presença nas células é o resultado de um dano cromossômico estrutural ou alteração numérica durante a mitose (FENECH et al., 1999; CELIK et al., 2003). Sendo assim, a análise de sua produção permite a detecção de tais danos, sendo assim, sua quantificação permite a determinação do efeito genotóxico causado por xenobióticos (FENECH, 2000).

Existem ainda outros compostos gerados pelo sistema microsossomal hepático, através de hidratação, hidroxilação e O-demetilação da AFB₁, são eles: AFB_{2a}, AFM₁, AFQ₁ e AFP₁. As AFM₁, AFQ₁, AFP₁ são compostos polares que são liberados dos hepatócitos e excretados na bile e na urina. A AFB_{2a} leva a diminuição de síntese protéica podendo conseqüentemente, causar imunossupressão (**Figura 2**) (SANTURIO, 2000).

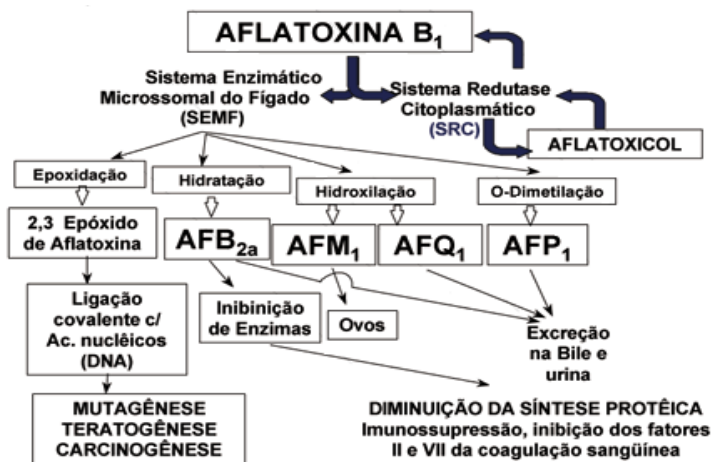


Figura 2. Metabolismo da AFB₁ em aves (SANTURIO, 2000).

2.4 Aflatoxicose em Aves

A aflatoxicose na avicultura é um problema de preocupação mundial, já que é comum a identificação de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo animal. Segundo levantamento feito por Binder et al. (2007), que analisaram a ocorrência desta toxina em diversos países distribuídos pela Europa, Ásia e Oceania, grande parte das amostras recebidas, entre elas milho, arroz, ração, ingredientes de ração, trigo, farelo de trigo, amendoim e outros, tinham contaminação por micotoxinas. O sudoeste e o sudeste da Ásia e a Oceania foram as regiões onde houve o maior número de amostras positivas para AFB₁, sendo encontradas concentrações médias de 38, 52 e 34 µg/kg, respectivamente. Dentre os diferentes tipos de amostras, as maiores concentrações foram encontradas em milho, um dos principais constituintes de ração para aves, e em rações finalizadas.

Da mesma forma, Fraga et al. (2007) em estudos sobre a produção de aflatoxinas e ocratoxina em ração voltada para avicultura, evidenciaram alta incidência e concentração de AFB₁ em rações no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Por sua vez, Dalcerro et al. (1997) isolaram AFB₁ nas concentrações de 17-197 ng/g em rações para avicultura, produzidas em cinco fábricas diferentes em Córdoba, Argentina.

Assim, as aflatoxinas são frequentemente isoladas e podem causar perdas expressivas para produtores e para a economia, além de causar sofrimento animal, afetando principalmente criação de aves, como frangos de corte e de postura.

Corroborando com essa possibilidade, Mariani (1998) constatou que a ingestão prolongada de aflatoxinas, a partir da concentração de 50 ppm, diminuiu o desempenho de frangos de corte principalmente na fase inicial (1-21 dias) de crescimento. Da mesma forma, Giambrone et al. (1985) evidenciaram os efeitos das doses de AFB₁ (100, 200, 400 e 800 ppb) administrada em perus e frangos de corte por 42 dias. Esses autores observaram diminuição significativa do ganho de peso e conversão alimentar para ambas as espécies, a partir de 400 ppb para peru e 800 ppb para frangos de corte. Além disso, vale ressaltar que ocorreu diminuição da imunidade celular, de forma dose dependente. No mesmo estudo Giambrone et al. (1985) evidenciaram morbidade e mortalidade combinada de 40% para concentração de 400 ppb e de 100% para 800 ppb para perus. Lesões hepáticas graves também foram encontradas, para ambas as espécies, sendo os frangos de cortes mais resistentes. Tais lesões variaram com as concentrações e com o animal estudado, mas de forma geral, o fígado apresentou-se macroscopicamente amarelado, com petéquias, e microscopicamente, com proliferação ductular, desorganização de placas de hepatócitos e hepatócitos porta com citoplasma vacuolizado.

Um dos principais efeitos tóxicos das aflatoxinas em frangos de corte é a hepatotoxicidade. As lesões hepáticas, quando de moderadas a severas, levam à alterações nos níveis séricos de enzimas relacionadas à função hepática como, por exemplo, a enzima aspartato amino-transferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). Segundo Tessari et al. (2005), aves intoxicadas experimentalmente com AFB₁ em diferentes concentrações (0, 50 e 200 µg/kg) por 42 dias, apresentaram um aumento significativo desta enzima a partir de 50µg de AFB₁/kg. De forma semelhante, Bintvihok et al. (2006) observaram um aumento significativo das enzimas AST e GGT em frangos de corte intoxicados com AFB₁ nas concentrações de 50 e 100 ppb.

Quanto ao efeito imunotóxico, Qureshi et al. (1998) observaram que pintos provenientes de galinha poedeiras intoxicadas por aflatoxinas nas concentrações de 0,2, 1,0 e 5,0 mg/kg, 2 vezes por semanas durante 14 dias, tiveram resposta vacinal significativamente menores para a resposta secundária contra hemácias de carneiro (antígeno T-dependente) em

todas as concentrações utilizadas. Já para antígeno T-independente de *Brucella abortus*, a diferença só foi significativa para a concentração de 5,0 mg/kg, além de demonstrarem macrófagos com potencial fagocítico reduzido.

Segundo Kumar et al. (2003), os órgãos linfóides também podem ser afetados pela AFB₁. Frangos de corte intoxicados com 0,5 ppm da toxina exibiram uma diminuição no peso relativo da bursa de Fabrícus demonstrando, histologicamente, congestão de leve a moderada e infiltrado de heterófilos. No timo, da mesma forma, houve diminuição do peso relativo do órgão, congestão, áreas multifocais de hemorragia e diminuição da espessura da região cortical. Por outro lado, no baço, houve aumento do peso relativo do órgão, congestão, áreas multifocais de hemorragia, atividade linfocitolítica leve da região periarteriolar do tecido linfóide, além de demonstrarem títulos vacinais contra o vírus da doença de Newcastle diminuídos significativamente.

2.5 Combate à Aflatoxicose

A intoxicação pela ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas é combatida de diversas formas, como por exemplo, através da inativação física, adição de adsorventes à ração e utilização de substâncias antioxidantes. Entre as formas de inativação por fatores físicos podemos citar o uso de altas temperaturas, acima de 150°C, para inativá-la ao menos parcialmente (RUSTOM, 1997). A exposição à luz ultravioleta também demonstrou efeito, reduzindo o nível de AFB₁ em 45,7% em figos contaminados experimentalmente por 250µg AFB₁/kg (ALTUG et al., 1990). Ainda segundo Ghanem et al. (2008), a degradação da AFB₁ correlaciona-se positivamente com o aumento da dose de radiação gama. As porcentagens de degradação da AFB₁ foram mais altas na dose de 10 kGy, obtendo-se valores de inativação de 58,6% para amendoim, 68,8% para pistache descascada, 84,6% para pistache com casca, 81,1% para milho e 87,8% para arroz, 90% em rações para cevada, 86% para farelo de trigo, 84% para milho.

Existe também uma série de adsorventes utilizados para diminuir os efeitos tóxicos da AFB₁, como o aluminossilicato de cálcio-sódio hidratado, que segundo Denli e Okan (2006) inibiu o aumento da atividade da enzima AST e do peso do fígado, além de mudanças histopatológicas, sugerindo que este adsorvente diminui o efeito negativo de aflatoxinas em frangos de corte.

Segundo Ortatali e Oguz (2001) e Ortatali et al. (2005) a adição simultânea do mineral clinoptilolito em rações contaminadas por aflatoxinas, melhora moderadamente os efeitos histológicos negativos sobre o fígado e órgãos linfóides. Ibrahim et al. (2000) observaram que a bentonita de sódio diminuiu significativamente o efeito negativo das aflatoxinas na porcentagem de fagocitose e na média da atividade fagocítica de heterófilos. Além disso, os autores destacam a melhora contra o efeito supressor das aflatoxinas sobre os títulos de anticorpos capazes de inibir a hemaglutinação do vírus da doença de Newcastle em frangos de corte vacinados.

Além dos compostos já citados, a utilização de antioxidantes também vem sendo estudada, na tentativa de melhorar os efeitos causados pelas aflatoxinas. Abdel-Wahhab e Aly, (2003) avaliaram o efeito de diferentes extratos vegetais antioxidantes como, o alho, repolho e cebola, em ratos intoxicados por aflatoxinas. Os autores constataram que houve uma melhoria significativa em todos os parâmetros estudados (ingestão alimentar, uréia, creatinina, colesterol e as enzimas aspartato amino-transferase, superóxido dismutase e glutatona). Naffeti et al. (2008) evidenciaram que o extrato de *Rhamnus alaternus* L. (planta com

atividade antioxidante) diminuiu significativamente a genotoxicidade induzida pela AFB₁, *in vitro*. Da mesma forma, Yener et al. (2009) testaram os efeitos protetores do extrato de semente de *Urtica dioica* L. em ratos intoxicados por aflatoxinas, observando melhoras em relação às alterações histopatológicas do fígado e de enzimas hepáticas.

2.6 Piperina

As espécies de pimenta, em especial a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e a pimenta longa (*Piper longum* L.), são amplamente usadas como temperos e como ingrediente em sistemas de medicina alternativa para tratamento de diversas doenças como asma e bronquite, dentre outras (PEI, 1983).

A piperina (**Figura 3**) é a principal amida constituinte dessas espécies de pimenta, e é abundante nestas planta, sendo extraída dos frutos secos com rendimento que varia entre 3 a 7% (IKAN, 1991), além de apresentar toxicidade reduzida para células de mamíferos e aves (PATHAK; KHANDELWAL, 2006, 2007, 2008; CARDOSO et al., 2009). Essa amida natural exibe uma variedade de efeitos biológicos, como atividade antipirética, analgésica, anti-inflamatória, antidepressiva, antioxidativa, antiapoptótica, antitumoral, antimetástática, imunomoduladora, anti-parasitária e hepatoprotetora (KOUL; KAPIL, 1993; PRADEEP; KUTTAN, 2002; SUNILA; KUTTAN, 2004; RIBEIRO et al., 2003; SELVENDIRAN et al., 2005a; SELVENDIRAN et al., 2005b; PATHAK; KHANDELWAL, 2006; SRINIVASAN, 2007).

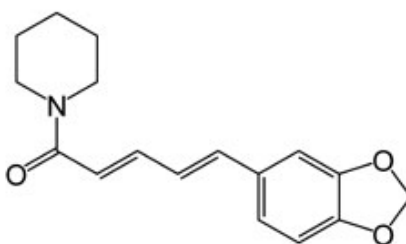


Figura 3. Estrutura química da piperina (PARMAR et al., 1997)

O efeito quimioprotetor da piperina vem sendo foco de investigações. Segundo Selvendiran et al. (2004), a suplementação oral de piperina a camundongos suíços albinos, pode modular a enzima ATPase e reduzir a formação de radicais livres na carcinogênese induzida por Benzo(a)pireno. Da mesma forma, Selvendiran e Sakthisekaran (2004) concluíram que a administração de piperina diminui significativamente os níveis de peroxidação lipídica, proteínas carbonilas, conteúdo de ácido nucléico e síntese de poliamina, que se encontram aumentadas em animais com câncer de pulmão induzido pelo Benzo(a)pireno. Lee et al. (2006) também descreveram o potencial protetor da piperina contra células PC12 intoxicadas por 1-metil-4-fenil piridinium. Além dos efeitos já descritos sob vários compostos tóxico e imunossupressores, a piperina também exerce efeito sobre intoxicação por AFB₁, *in vitro*, em células de hamsters chineses V19, diminuindo citotoxicidade e a produção de micronúcleo (REEN et al. 1997).

A atividade imunomoduladora da piperina também vem sendo recentemente investigada, porém, com resultados contraditórios quanto a sua capacidade imunoestimulatória. Sunila e Kuttan (2004) descreveram que a piperina foi capaz de aumentar a resposta imune humoral para antígeno T-dependente em camundongos inoculados com piperina (1,14 mg/dose/animal), via intra-peritoneal. Todavia, no mesmo ano, Dogra et al. (2004) demonstraram que, pelo contrário, a piperina suprimiu a resposta imune, de forma dose-dependente, em camundongos inoculados por gavagem com 1,14, 2,25 e 4,5 mg/kg. A dose de 1,14 mg/kg foi considerada segura para uso, não demonstrando qualquer efeito tóxico para células e tecidos imunes (DOGRA et al. 2004).

Pathak e Khandelwal (2006, 2007, 2009) demonstraram, *in vitro*, que a piperina por si só não foi capaz de modular a blastogênese ou a função de células B e T, porém, demonstrou eficiente efeito imunoprotetor, apresentando atividade antioxidativa, antiapoptótica e restauração da capacidade mitótica e funcional de timócitos e esplenócitos de camundongos intoxicados por cádmio, sugerindo seu uso terapêutico em condições imunossupressoras. Esse efeito protetor da piperina também foi verificado para AFB₁, *in vitro*, por Singh et al. (1994), e, *in vivo*, em estudos desenvolvidos por nosso grupo. Nesses estudos, verificamos que a piperina foi capaz de impedir os efeitos imunossupressores da aflatoxinas em ratos intoxicados (GAGINI et al., no prelo).

Kim e Lee (2009) avaliaram a atividade anti-inflamatória e antiasmática da piperina em modelo murino de asma. Nesse modelo, a piperina (2,25 e 4,5 mg/kg) administrada oralmente em camundongos sensibilizados com ovalbumina foi capaz de prevenir a infiltração de eosinófilos e inflamação no tecido pulmonar. Tal efeito anti-inflamatório ocorreu devido à supressão da síntese de IL-4, IL-5, IgE e histamina, sugerindo que o mecanismo terapêutico seja baseado na ação supressora da piperina sobre as atividades de células T e sobre a produção de citocinas-Th2. Os resultados contraditórios revelados pela literatura mostram a necessidade de maiores estudos sobre a capacidade imunomoduladora dessa amida natural, principalmente, levando-se em conta a dose e a via de administração empregada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aves e Manejo

Primeiramente, 200 pintos machos, de um dia de vida, da linhagem comercial *Cobb avian 500* (linhagem de frango corte) foram obtidos a partir da Granja Gramado Avicultura e Agropecuária, RG. Destes, 60 pintos foram escolhidos visando obtenção de aves uniformes para início do ensaio. Todos os pintos foram pesados, para que a distribuição dos mesmos obedecesse à uniformidade de peso vivo ($236 \text{ g} \pm 12 \text{ g}$). Até o sétimo dia de idade, as aves foram alojadas em galpões convencionais da Fazenda Experimental no Setor de Avicultura do Instituto de Zootecnia, UFRRJ, com círculo de proteção com campânula à gás, comedouros tipo bandeja e bebedouros tipo copo, com temperatura e umidade monitoradas através de termômetro de temperatura máxima e mínima, recebendo ração adequada e água *ad libitum*.

No sétimo dia, os pintos foram transferidos para duas baterias metálicas com três andares cada, com dois compartimentos de $0,90 \times 0,85 \times 0,40\text{m}$, por andar, contendo cada um, bebedouro infantil do tipo copo (2,5 L) e comedouro tipo bandeja. Utilizou-se, portanto, um total de 12 compartimentos, sendo, distribuídos cinco animais em cada compartimento.

Aos dez dias de idade, os comedouros e bebedouros infantis foram substituídos por comedouro e bebedouros tipo calha, que ficavam na parte externa das unidades experimentais, cujo comprimento equivalia às dimensões do compartimento que tinham em média 10 cm de largura.

A composição da ração para frangos de corte atendeu as exigências nutricionais segundo Rostagno (2005), sendo elaborada na fábrica de ração do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. Previamente, foram realizadas análises micotológicas da ração, segundo metodologia de Soares e Rodriguez-Amaya, (1989), com o auxílio da Profa. Dra. Glória Maria Direito, IV/UFRRJ, para que não ocorressem alterações nos parâmetros imunológicos e hematológicos influenciadas por micotoxinas que pudessem estar contaminado os componentes da ração (grãos).

O alojamento das aves e a elaboração da ração foram realizados com o auxílio da Profa. Dra. Cristina Amorim Ribeiro de Lima, IZ/UFRRJ.

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas éticas, sendo aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP) sob o número de protocolo 015/2008.

3.2 Obtenção da Piperina e Incorporação na Ração

A piperina foi cedida pelo Prof. Dr. Marco Edílson Freire de Lima, ICE/UFRRJ. A amida natural foi purificada a partir dos frutos secos de *Piper nigrum* L., empregando etanol como solvente, conforme descrito por Ikan (1991), com rendimento de 5-7% e elevado grau de pureza (~98%), determinado por GC-MS, demonstrando ponto de fusão ($128-129^\circ\text{C}$) e dados espectrométricos (^1H and ^{13}C NMR, IR e MS) idênticos ao reportado na literatura (ARAUJO-JUNIOR et al., 1997; SIDDIQUI et al., 1997).

Após sua obtenção, a piperina foi incorporada à ração na concentração de 60 ppm, concentração esta estabelecida previamente em experimentos realizados em nosso laboratório (CARDOSO, 2009). Após a incorporação da piperina à ração, foram realizadas análise e quantificação da mesma por cromatografia gasosa e espectrometria de massa para confirmação da presença, e da concentração desejada, da amida na ração.

3.3 Obtenção e administração de AFB₁ em frangos de corte

As aflatoxinas foram obtidas no Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a partir de cepas de *Aspergillus parasiticus* (CMDB 0336, origem: NRRL 2999), cultivadas em ágar YES por 11 dias a 25 °C. Após este período as culturas foram submetidas a processo de extração com clorofórmio P.A. (50 mL/placa), filtradas em filtro de papel *Whatman* n° 1, e o extrato obtido foi concentrado até resíduo em rotoevaporador. Os extratos secos foram, posteriormente, diluídos em 1,0 mL de clorofórmio e analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), em folhas de sílica gel 20 X 20 cm, ativadas por 1 hora a 120°C. Os extratos foram separados com a fase móvel composta de tolueno: clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico 90%, na proporção de 70:50:50:20.

Após a confirmação da presença de AFB₁ na CCD foi feita uma CCD preparativa, ou seja, nova corrida dos extratos também em folhas de sílica gel (20 X 20 cm) de espessura maior para a purificação da AFB₁, com as mesmas condições citadas anteriormente. Os pontos correspondentes às características de fluorescência e corrida compatível com o padrão de AFB₁, na sílica gel, foram retirados da sílica por raspagem e subsequentemente extraídos por clorofórmio. Esses extratos foram então filtrados em filtro de papel *Whatman* n° 1, e concentrados em rotoevaporador. Os extratos secos foram diluídos em 1,0 mL de clorofórmio.

A quantificação da AFB₁ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna de sílica (coluna Microsorb, Vican, 4μ, 4,6 x 15 cm), cromatógrafo líquido equipado com bombas Waters (modelo 510), injetora Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, California – EUA) com *loop* de 20 μL, detectores de fluorescência Agilent série 1100 e de UV-VIS Merk-Hitachi L-4250 e Chromato-integrador D-2500, do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A detecção da fluorescência foi obtida com excitação de 330 nm e emissão de 460 nm e comparada com UV a 350nm. As fases móveis utilizadas foram compostas pela mistura de acetato de etila:n-hexano (3:2.5, v/v), para detecção por fluorescência, e com a mistura de metanol:água (1:1, v/v), para a detecção por UV.

Os extratos foram evaporado, em rotoevaporador, e o extrato seco foi dissolvido em óleo de soja à temperatura de 60°C com o auxílio de ultrassom por 30 minutos. . Os animais foram pesados todos os dias durante o período de experimentação e a quantidade de AFB₁ calculada para satisfazer a concentração de 0,5mg/kg de peso corporal. A AFB₁ foi administrada diariamente, por gavagem, utilizando-se óleo de soja como veículo, até o final do experimento.

3.4 Protocolo de Vacinação

Todos os frangos receberam duas doses de vacina (New-vacin La Sota, laboratório Bio-Vet S/A) para o vírus da doença de Newcastle via ocular: a primeira dose com 9 dias de idade e a segunda dose da vacina com 28 dias de idade, para avaliar a resposta vacinal primária e secundária. A resposta imune humoral para a vacinação foi acompanhada semanalmente (aos 9, 14, 21, 28, 35 dias de idade) até o final do experimento (Figura 4). Os soros foram obtidos por coleta de sangue, pela punção de veias alares (braquial ou ulnar) e foram armazenados a -20 °C e, posteriormente, verificada a presença de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (ELISA) e titulação de anticorpos protetores através da técnica de inibição da hemaglutinação (HI).

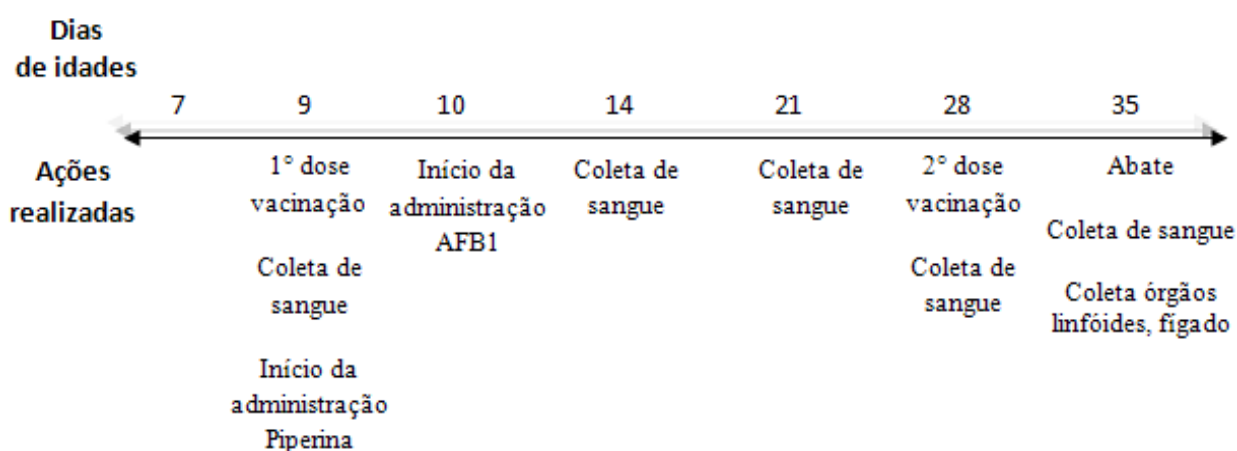


Figura 4. Esquema de vacinação e das principais ações realizadas durante o experimento. Com sete dias de idade os frangos foram separados em grupos (n=5) e alojados em compartimentos separados. A experimentação teve início após dois dias de adaptação dos frangos ao novo ambiente.

3.5 Delineamento Experimental

Aos sete dias de idade os frangos de corte (n = 60), foram separados em quatro grupos de 15 animais cada, conforme descrito na **Tabela 1**. A alimentação dos frangos com ração misturada com piperina teve início aos nove dias de idade, um dia antes do início da intoxicação com AFB₁ (10 dias de idade). As aves foram pesadas diariamente e a quantidade de AFB₁ a ser administrada foi recalculada quando necessário.

Tabela 1. Tabela demonstrando o tratamento em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Tratamentos	
	Piperina (ppm)	AFB ₁ (mg/kg)
C	0	0
P	60	0
A	0	0,5
PA	60	0,5

C- Grupo controle: frangos que receberam apenas o veículo (óleo de soja) utilizado na gavagem dos animais com AFB₁. P- Grupo piperina: frangos que receberam piperina misturada à ração. A- Grupo AFB₁: frangos que receberam AFB₁, por gavagem. PA- Grupo piperina + AFB₁: frangos que foram alimentados com ração contendo piperina e intoxicados com AFB₁. O tempo de experimentação durou 26 dias, sendo os frangos abatidos, conforme as recomendações do Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), aos 35 dias de idade.

O sangue das aves foi coletado aos 9, 14, 21, 28 e 35 dias de idade para obtenção do soro para pesquisa de anticorpos. Também foi feita coleta de sangue no dia do abate, uma parte coletada com EDTA, para a realização da contagem total e diferencial de leucócitos e para o teste de micronúcleo, e outra parte foi coletada sem anticoagulante, para dosagem das enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). Ao final do experimento, os frangos foram pesados e, após jejum de seis horas foram abatidos. A eutanásia foi realizada através de atordoamento seguido de sangria. Após eutanásia, os animais foram escaldados a 54 °C por 2 minutos, depenados em máquina e eviscerados manualmente. Em seguida, foi realizada a necropsia para verificação de alterações macroscópicas nos órgãos linfóides e fígado. Foi coletado o timo, o baço e a bursa de Fabrício para avaliação histopatológica e pesagem, e o fígado para necropsia e pesagem.

3.6 Verificação da Intoxicação pela AFB₁

Foram realizados testes para verificar se a concentração de AFB₁ utilizada (0,5mg/kg) foi suficiente para causar intoxicação. Os ensaios foram realizados somente no grupo controle e no grupo da AFB₁ (grupo A). Dentre as características principais da intoxicação causada por esta micotoxina, foram avaliados os efeitos: (i) sobre o ganho de peso; (ii) hepatotóxicos como, o aumento do peso do fígado, lesões macroscópicas, e dosagem da enzima hepática AST e GGT; (iii) citotóxico para medula óssea, através da frequência de eritrócitos imaturos (PCE) no sangue periférico; (iv) genotóxicos através da verificação de danos ao DNA, pelo teste do micronúcleo.

3.6.1 Avaliação das alterações hepáticas

As avaliações macroscópicas foram feitas no momento do abate, quando foram observadas possíveis alterações no tamanho (peso), coloração ou presença de lesões aparentes nos fígados.

O sangue coletado sem anticoagulante, após 2 horas a temperatura ambiente, foi centrifugado a 400 x g, por 5 minutos para obtenção do soro. Os soros dos frangos dos grupos C e A, foram submetidos à dosagem da enzima AST e GGT. As análises foram realizadas com “kit” comercial (Bioclin SA), utilizando espectrofotômetro automático Bio-2000 (Bioplus), com calibração automática e leitura de alta performance. Os testes foram realizados por método cinético, de acordo com a metodologia indicada pelo fabricante.

3.6.2 Frequência de PCE e teste do micronúcleo

Um esfregaço do sangue periférico de cada animal foi feito, sendo no dia posterior fixados em metanol P.A. por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com solução de Giemsa 10%. Após secagem, as lâminas foram codificadas e armazenadas em caixas apropriadas, à temperatura ambiente, até o momento da leitura. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico em resolução 1000 x. A análise das lâminas foi realizada em teste cego, sendo o número de eritrócitos policromáticos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs) determinado em um total de 500 eritrócitos, por lâmina (duas por animal), sendo portanto, a frequência de PCE dada pela sua porcentagem em um total de 500 eritrócitos. Já para o teste do micronúcleo foi feita a contagem de 1000 hemácias por lâmina (duas lâminas/animal) (CAMPANA et al., 1999; GRISOLIA, 2002) sendo determinado o número de PCEs micronucleados (MNPCEs) e NCEs micronucleados (MNNCEs). Os micronúcleos (MNs) foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech et al. (1999).

3.7 Avaliação do Efeito Imunoprotetor da Piperina

3.7.1 Avaliação macroscópica e pesagem dos órgãos linfóides

Para avaliação do efeito imunoprotetor da piperina sobre a intoxicação por AFB₁, os órgãos linfóides (timo, bursa de Fabrício e baço) de 10 animais de cada um dos grupos, foram inspecionados macroscopicamente, sendo anotadas possíveis alterações. O peso do baço e da bursa foi dada pela média do peso dos mesmos. Entretanto, para o timo foi feita pesagem dos órgãos e em seguida contagem do número de nódulos, e então calculada a média do peso por nódulo tímico.

3.7.2 Análise histopatológica dos órgãos linfóides

Os órgãos linfóides de quatro animais/grupo foram fixados em solução de Bouin (BUERGELT, 1997) por 6 horas. Posteriormente, banhos sucessivos de álcool 70% foram aplicados sobre as amostras para a retirada do fixador, em seguida, desidratadas em uma série de concentração crescente de álcoois. Após a desidratação do material, as amostras foram recortadas em fragmentos menores, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os procedimentos histotécnicos foram realizados com o apoio do Laboratório de Histologia, IB/UFRRJ. As análises histológicas foram realizadas em seções de 5 µm, coradas por hematoxilina/eosina (BEHMER et al., 1976) e examinadas em microscopia óptica com o microscópio Olympus® (CH30) aumento de 200 e 400 x acoplada a uma câmera digital Nikon® (Colpix 4300).

A análise histopatológica dos cortes de tecidos linfóides foram realizados levando-se em conta à estimativa do grau de lesão relacionada ao órgão e a patologia apresentada. Caracterizou-se o grau de lesão conforme a escala demonstrada no **Quadro 1**.

Quadro 1. Escores histopatológicos referentes às lesões encontradas nos cortes histológicos dos órgãos linfóides (timo, baço e bursa de Fabricius), após 26 dias de experimentação.

Grau de Lesão	Escore
Ausência	-
Leve	+
Moderada	+(+)
Acentuada	++

3.7.3 Leucometria total e diferencial

A contagem de leucócitos totais foi realizada a partir do sangue periférico coletado com anticoagulante no dia do abate. A contagem foi realizada em hemocítômetro, através da diluição do sangue em 1/100 utilizando-se a solução de Natt e Herrick (1951). O número total de leucócitos foi obtido multiplicando-se o número de células contadas nas 25 subdivisões do quadrante central do hemocítômetro por 1000 (fator de correção, considerando-se área, altura da câmara e diluição).

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaços sangüíneos corados com solução de Giemsa 10% para determinação dos valores relativos e posteriormente, dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

3.7.4 Quantificação de anticorpos específicos para o vírus da doença de Newcastle por ELISA

A quantificação de anticorpos vacinais foi realizada através do teste de ELISA nos soros coletados aos 9, 14, 21, 28 e 35 dias de idade, conforme as recomendações do fabricante (FlockChek Newcastle Disease Virus Antibody Test Kits). A leitura das densidades óticas foi feita em espectrofotômetro de placa (Bio-Rad 680) a 655nm.

3.7.5 Titulação de anticorpos protetores para o vírus da doença de Newcastle pela técnica de Inibição de Hemaglutinação (HI)

A técnica do HI foi realizada segundo as recomendações do Programa Nacional de Sanidade Avícola do MAPA (BRASIL, 1994), com os mesmos soros empregados no ELISA. Para esse teste, todos os soros foram inativados por 30 minutos a 56°C em banho-maria. Em seguida, foi feita absorção de anticorpos inespecíficos através da incubação dos soros com papa de hemácias de galinha 50%, v/v, por 1 hora a 4 °C. A mistura foi centrifugada (400 x g/ 5 minutos) e o sobrenadante guardado a 4 °C até o momento do teste.

Em placa de 96 cavidades, fundo em “U”, foi acrescentado 25 µL de solução salina tamponada (SST), pH 7,2 em todas as cavidades; em seguida foi feita a diluição seriada de cada soro (1:2 até 1: 512). Acrescentou-se 25 µL do vírus vacinal, obtido a partir do líquido alantóico de ovos embrionados inoculados (BRASIL, 1994), à 4 UHA em cada cavidade. Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi acrescentado em todas as cavidades 25 µL de uma suspensão de hemácias 1%, sendo incubada por mais 30 minutos, procedendo-se a leitura.

Para cada placa foi feito um controle de papa de hemácias 1% (25 µL de papa de hemácias 1% + 25 µL de SST) e um controle do vírus (25 µL do vírus 4UHA + 25 µL de SST + 25 µL papa de hemácias). O título de anticorpos presentes no soro foi determinado pela maior diluição do soro capaz de inibir a atividade hemaglutinante do vírus, e o resultado expresso pela média geométrica do título.

3.8 Análise Estatística

Os parâmetros avaliados foram mostrados em tabelas ou gráficos, e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. A significância das médias do grupo controle e AFB₁, obtidas no estudo da capacidade tóxica da concentração de AFB₁ empregada nesse estudo foi realizada pelo teste T (Mann-Whitney U). A significância das médias dos diferentes parâmetros entre os quatros grupos experimentais, nos estudos da capacidade imunoprotetora da piperina, foi avaliada por análise de variância (ANOVA), empregando os testes de *Newman-Keuls* e *Kruskal Wallis* para comparação dos grupos, nas análises paramétricas e não paramétricas, respectivamente. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0.05$. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do programa *GraphPad Prism 3.0* para *MS Windows* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*).

4 RESULTADOS

Durante os 26 dias de experimentação foi verificada uma taxa de mortalidade de 3,3% (2/60). As mortes foram verificadas em um frango com 17 e outro com 29 dias de idade, dos grupos piperina + AFB₁ e AFB₁, respectivamente, sendo estes necropsiados. Macroscopicamente, os fígados apresentaram um aspecto pálido e friável, além do aumento do tamanho, em ambos os animais. Entretanto o fígado do animal intoxicado apenas com AFB₁ apresentou-se com um aspecto pálido e amarelado mais intenso, sugestivo de degeneração gordurosa (esteatose) (**Figura 5**).

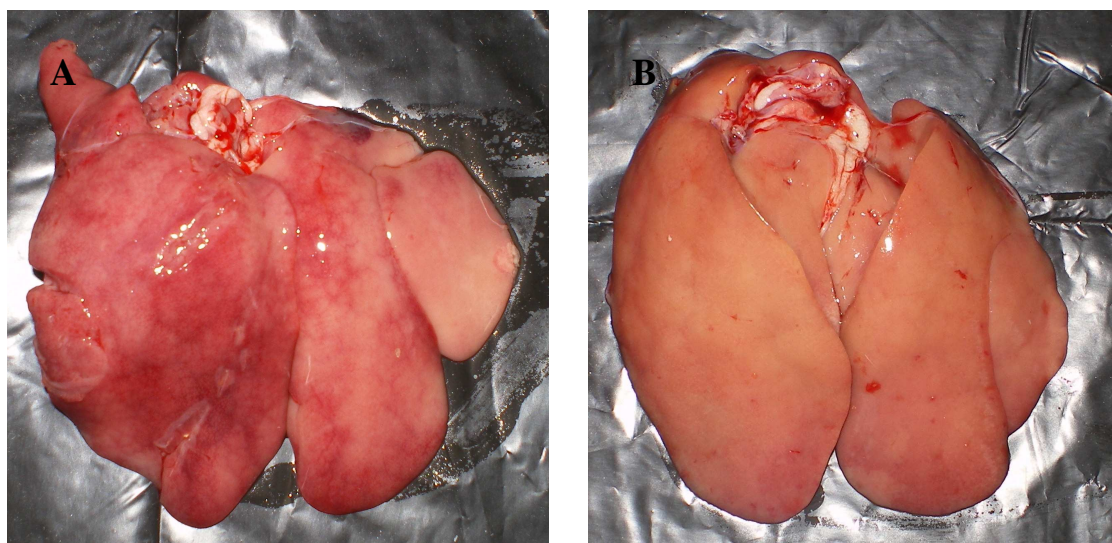


Figura 5. Foto do fígado de aves que morreram durante o experimento. **A-** fígado da ave do grupo piperina + AFB₁, óbito aos 17 dias de idade. **B-** Fígado da ave do grupo AFB₁, óbito aos 29 dias de idade.

4.1 Determinação dos efeitos tóxicos da concentração de AFB₁ empregada no estudo

Os frangos de corte intoxicados com AFB₁ foram avaliados quanto aos efeitos sobre: ganho médio de peso das aves, peso relativo do fígado, alteração das enzimas hepáticas AST e GGT e genotóxicos, citotoxicidade da medula óssea e danos cromossômicos após 26 dias de experimentação.

Os resultados observados, quanto ao ganho médio de peso, peso relativo do fígado e a dosagem da enzima hepática AST e GGT no grupo A, apresentaram aumento significativo em relação ao grupo C, sugerindo efeito hepatotóxico. Tais resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e demonstrados na **Tabela 2**. Os fígados das aves intoxicadas por AFB₁ demonstraram alterações da aparência normal apresentando aspecto friável, pálido e amarelado.

Tabela 2. Parâmetros citotóxicos relativos à intoxicação prolongada (25 dias) de AFB₁ em frangos de corte.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	AF1
Ganho médio de peso das aves (g)	2.039,0 ^a ± 63,54	1.929,0 ^b ± 37,0
Peso relativo do fígado¹ (g/kg)	1,732 ^a ± 0,076	1,961 ^b ± 0,247
AST (UI/L)	283,0 ^a ± 59,60	468,7 ^b ± 177,3
GGT (UI/L)	9,278 ^a ± 2,989	18,670 ^b ± 2,791

^{a e b} Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

¹ Peso do fígado/peso vivo.

Verificou-se aumento significativo ($p < 0,001$) na frequência de micronúcleos nos eritrócitos do sangue periférico de frangos de corte intoxicados com AFB₁ quando comparada com frangos de corte não intoxicados (controle). Os micronúcleos foram evidenciados apenas em NCE, provavelmente, pela baixa frequência de PCE. O aumento do número de micronúcleos nos eritrócitos em frangos do grupo A, em relação ao grupo C, foi acompanhado pela diminuição da frequência de PCE no sangue periférico. A frequência de micronúcleos em eritrócitos sanguíneos, e a relação entre eritrócitos imaturos (policromáticos - PCE) e maduros (normocromáticos-NCE) das aves do grupo A e do grupo C estão demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Média do número de micronúcleos encontrados em 1000 eritrócitos e contagem diferencial de eritrócitos policromáticos e normocromáticos em um total de 500 eritrócitos nos grupos controle e AFB₁.

Tratamentos	Micronúcleo	Tipos de eritrócitos		Frequência de PCE (%) ³
		PCE ¹	NCE ²	
Controle	0,125 ^A ± 0,35	105,60 ^{bA} ± 6,14	394,40 ^{aB} ± 6,14	21,12
AFB₁	4,5 ^B ± 1,41	27,88 ^{bB} ± 8,08	472,1 ^{aA} ± 8,66	5,58

¹ Números de eritrócitos policromáticos;

² Número de eritrócitos normocromáticos;

³ Frequência de PCE (%) = $(n^\circ \text{ PCE} / n^\circ \text{ PCE} \times n^\circ \text{ NCE}) \times 100$.

^a letras minúsculas, diferença estatística ($p < 0,001$), em uma mesma linha;

^A letras maiúsculas diferença estatística ($p < 0,001$), em uma mesma coluna.

Os resultados foram analisados pelo teste t-Student não paramétrico (Mann Whitney U).

A diminuição da frequência de PCE no sangue periférico é considerada como indicador de citotoxicidade induzida por mutagênese (SUZUKI et al., 1989), relevando o potencial citotóxico da AFB₁ sobre a medula óssea. A **Figura 6** mostra a presença de micronúcleo em NCE do sangue periférico e a observação de heterófilos alterados (tóxicos) nos esfregaços sanguíneos dos animais intoxicados com AFB₁.

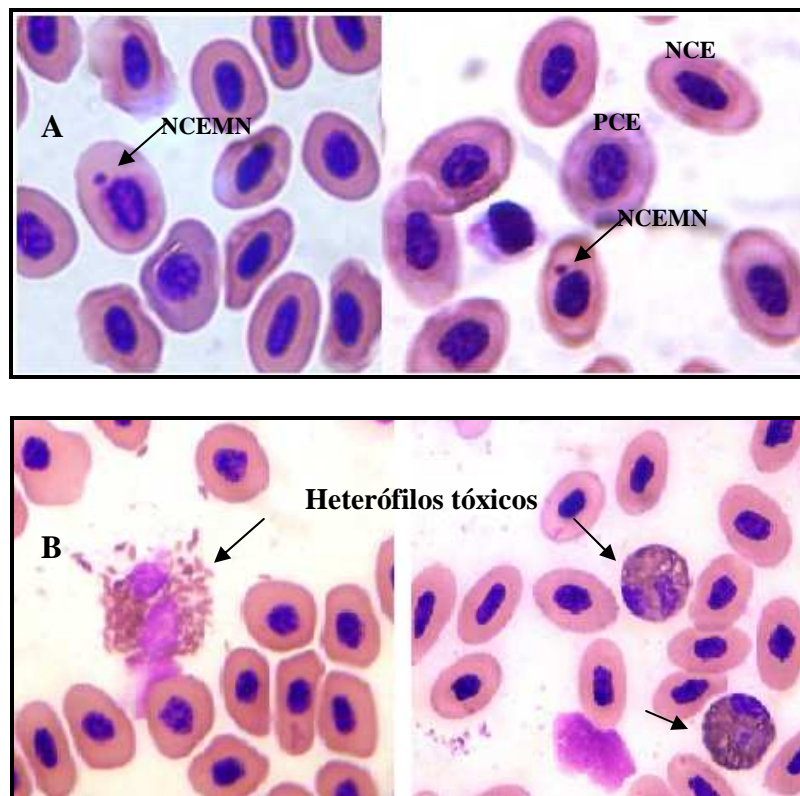


Figura 6. Fotomicrografia com aumento de 1000 X em microscópio óptico (Olympus® CH30). (A) NCEMN: Eritrócitos normocromáticos com micronúcleo indicados pela seta. PCE: eritrócitos policromáticos, NCE: eritrócitos normocromáticos. (B) Heterófilos tóxicos observados em esfregaços sanguíneos de frangos de corte intoxicados com AFB₁.

4.2 Avaliação do Efeito Imunoprotetor da Piperina

4.2.1 Avaliação macroscópica e pesagem dos órgãos linfóides

A avaliação macroscópica dos órgãos linfóides revelou a presença de petéquias no timo de animais intoxicados por AFB₁, não encontradas nos outros grupos estudados (**Figura 7**). No entanto, o baço e a bursa de Fabricius não demonstraram lesões macroscópicas em nenhum dos grupos estudados.

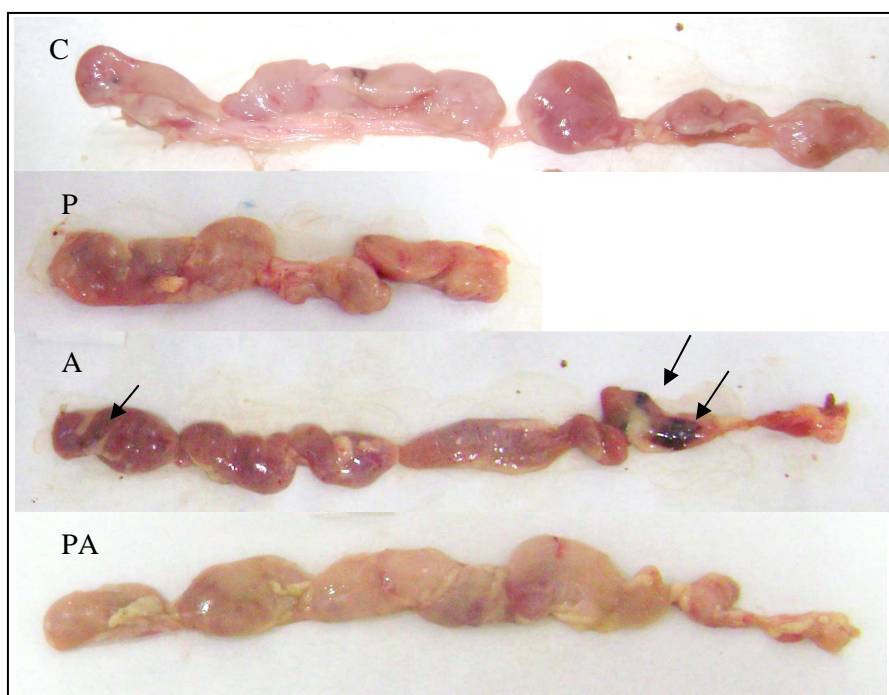


Figura 7. Fotografia do timo nos diferentes grupos estudados. C - controle; P - piperina; A- AFB₁; PA - piperina + AFB₁; Setas demonstrando pontos hemorrágicos.

Através da análise do peso médio do nódulo tímico, podemos observar que houve uma diminuição significativa do peso deste órgão para o grupo de animais intoxicados por AFB₁, em relação aos demais grupos. O grupo de frangos que recebeu piperina e foram intoxicados com AFB₁ não apresentou mudança significativa no peso médio do nódulo tímico, tanto em relação ao controle quanto ao grupo que recebeu apenas piperina. Por outro lado, não houve diferença significativa do peso médio do baço, nem da bursa de Fabricius, entre os diferentes grupos estudados (**Figura 8**).

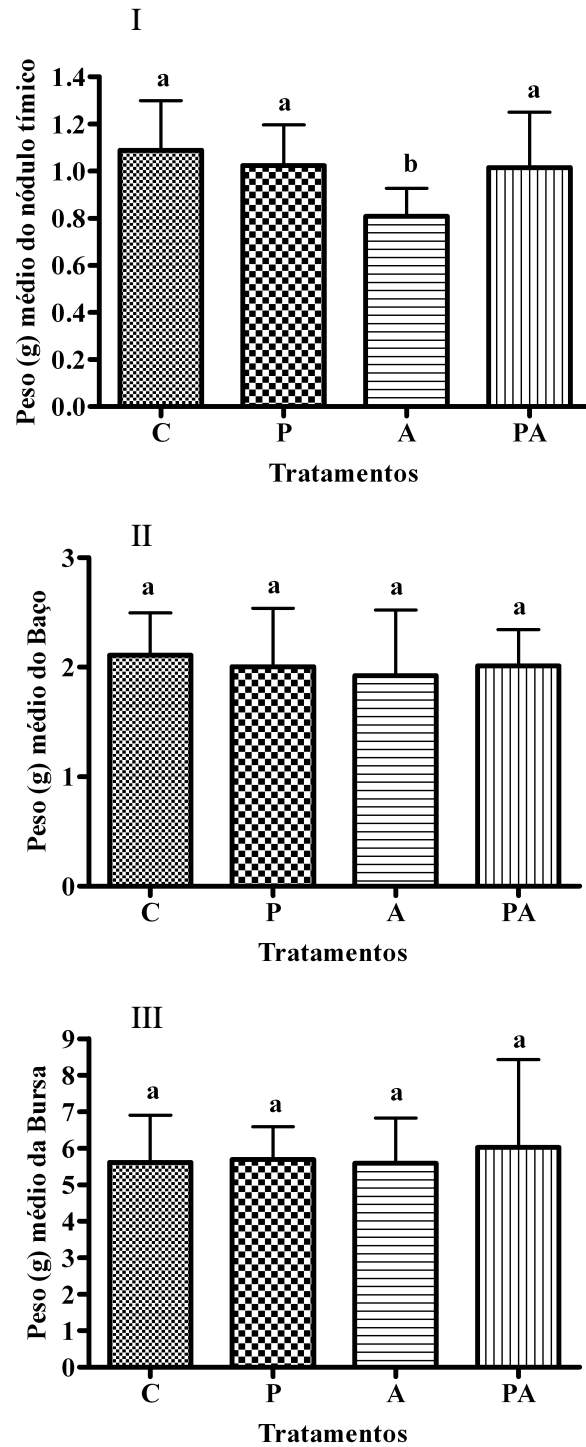


Figura 8. Peso médio do nódulo tímico (I), Peso médio do baço (II) e Peso médio do bursa de Fabrícus (III), em relação aos grupos controle (C), piperina (P), AFB₁ (A) e piperina + AFB₁ (PA). As médias do peso dos órgãos foram analisadas quanto a significância por análise de variância one way ANOVA, com as médias comparadas pelo teste de *Newman Keuls*. ^a Letras minúsculas Indicam diferença estatística, com p < 0,01.

4.2.2 Histopatologia dos órgãos linfóides

Na **Tabela 4** estão demonstrados os resultados da análise histopatológica dos órgãos linfóides de cada grupo experimental.

Timo: A análise dos cortes histológicos do timo dos animais intoxicados com AFB₁ e que não receberam piperina, revelou na região medular congestão multifocal, hemorragia focal, necrose do tecido linfóide com fibrose focal e depleção de linfócitos. Ocorreu ainda, mineralização multifocal, principalmente na região medular do timo. As lesões causadas pela AFB₁ estão representadas na **Figura 9 (A e B)**. Os frangos não intoxicados (grupos controle e piperina) não apresentaram qualquer alteração histopatológica nos cortes analisados, com exceção das aves alimentadas com 60 ppm de piperina que apresentaram uma discreta depleção de linfócitos. As lesões observadas no timo (congestão, hemorragia e necrose) das aves intoxicadas, ou a intensidade das lesões (necrose, mineralização e depleção de linfócitos) foram ausentes ou menores nos frangos intoxicados com AFB₁ que foram tratados com 60 ppm de piperina misturada à ração (**Figura 9 D**).

Baço: A AFB₁ promoveu leve congestão (**Figura 10**) e necrose apenas para o grupo de animais que não receberam piperina. Por outro lado, o grupo de animais que receberam apenas piperina apresentou apenas uma leve hemorragia.

Bursa de Fabrícus: Os cortes histológicos não apresentaram lesões em nenhum dos grupos estudados, nem mesmo a AFB₁ não foi capaz de promover lesão tecidual na bursa de Fabrícus (**Figura 11**).

Tabela 4. Níveis das lesões encontradas nos órgãos linfóides (timo, baço e bursa de Fabrícus), para os diferentes grupos estudados.

Lesões ¹	Timo				Baço				Bursa de Fabrícus				
	C ²	A ³	P ⁴	PA ⁵	C	A	P	PA	C	A	P	PA	
Congestão	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hemorragia	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Necrose	-	+(+)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mineralização	-	+(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Depleção de linfócitos	-	+(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Grau das lesões: - ausência; + leve; +(+) moderada; ++ acentuada

Grupos ²controle, ³piperina 60 ppm, ⁴AFB₁ 0,5mg/kg e ⁵piperina + AFB₁.

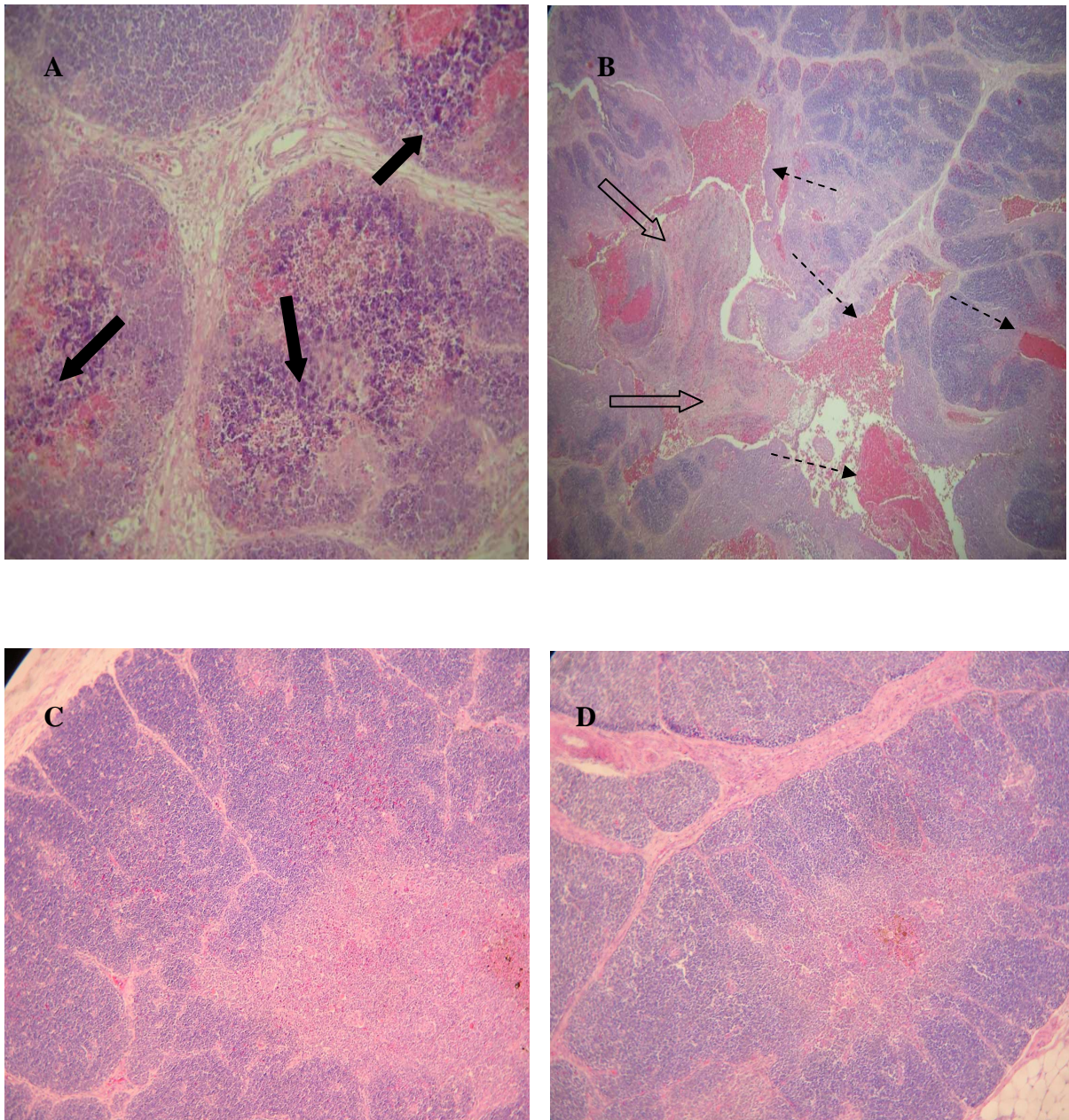


Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de timo corado com hematoxilina- eosina. **A-** grupo AFB₁, aumento de 200x; **B** grupo AFB₁, aumento de 50x. **C-** timo de animal do grupo controle, com aumento de 100x; **D-** timo do grupo de piperina e AFB₁, com aumento de 100x. Seta preenchida indicando mineralização, seta não preenchida indicando fibrose e seta tracejada indicando congestão.

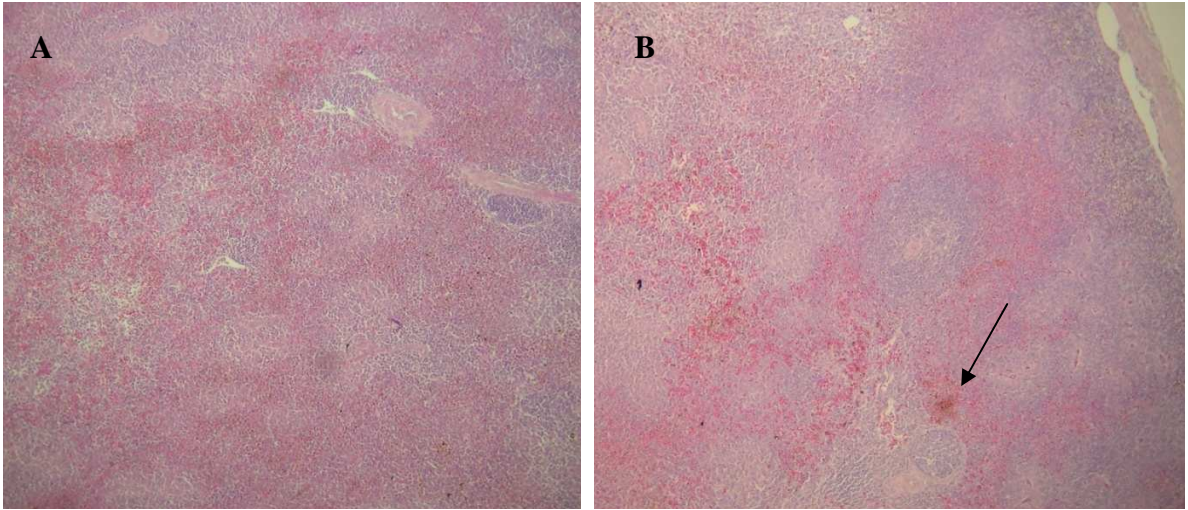


Figura 10 Fotomicrografias de cortes histológicos de baço, corado com hematoxilina- eosina, aumento de 200x, de frangos de corte pertencentes ao grupo controle (A) e de animal intoxicado por AFB₁(B). Seta indicando congestão leve.

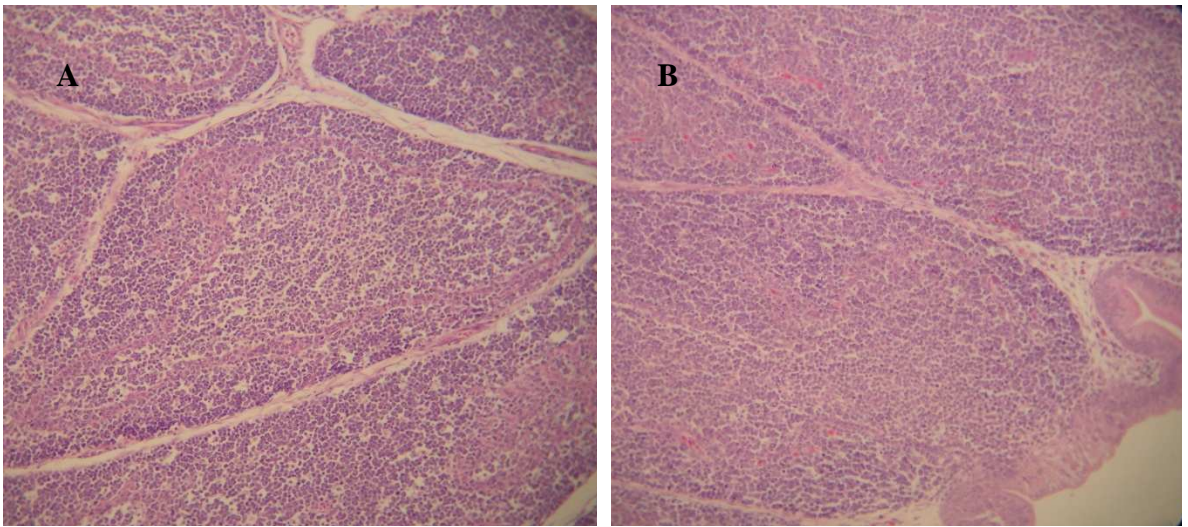


Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos da bursa de Fabrícus, corados com hematoxilina- eosina, aumento de 200x, de frangos de corte pertencentes aos grupos controle (A) e intoxicado por AFB₁(B).

4.2.3 Leucometria e contagem diferencial

A capacidade da piperina em impedir a ação supressora da AFB₁ sobre os linfócitos circulantes foi avaliada através da contagem do número total de leucócitos e sua contagem diferencial em esfregaço sanguíneo. Na **Figura 12** podemos observar que a AFB₁ foi capaz de diminuir significativamente o número total de leucócitos ($p < 0,05$) dos animais intoxicados, porém, quando os frangos de corte receberam 60 ppm de piperina misturada à ração, essa diminuição não foi observada (grupo PA), não havendo diferença significativa em relação ao grupo controle e piperina.

Na contagem diferencial dos leucócitos, observou-se diminuição significativa do número de linfócitos ($p < 0,001$) e heterófilos ($p < 0,01$) dos animais intoxicados com AFB₁ em relação ao grupo controle. A alimentação das aves com ração contendo 60 ppm de piperina não alterou a contagem das diferentes tipos de leucócitos, entretanto, a piperina foi capaz de impedir os efeitos tóxicos sobre linfócitos e heterófilos em relação ao grupo controle (**Figura 13**).

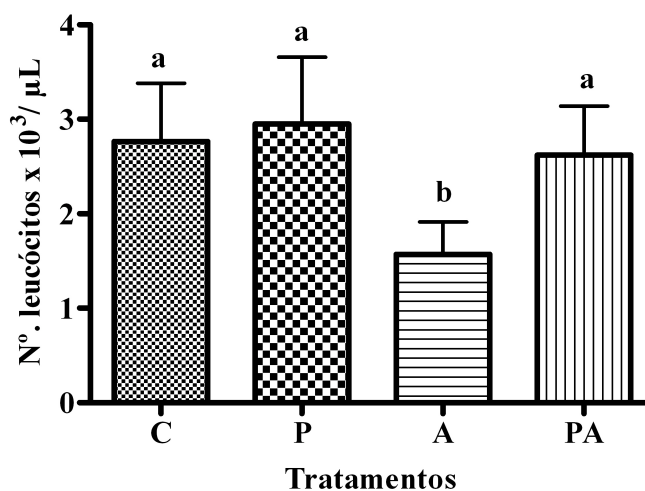


Figura 12. Efeito da piperina sobre a leucometria em frangos de corte intoxicados por AFB₁. Os resultados estão expressos pela média aritmética do grupo \pm desvio padrão de 15 animais/grupo (C, controle; P, piperina; A, AFB₁; PA, piperina + AFB₁). A análise estatística foi realizada por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste de Newman-Keuls. ^a Letras diferentes indicam diferença estatística, com $p < 0,05$.

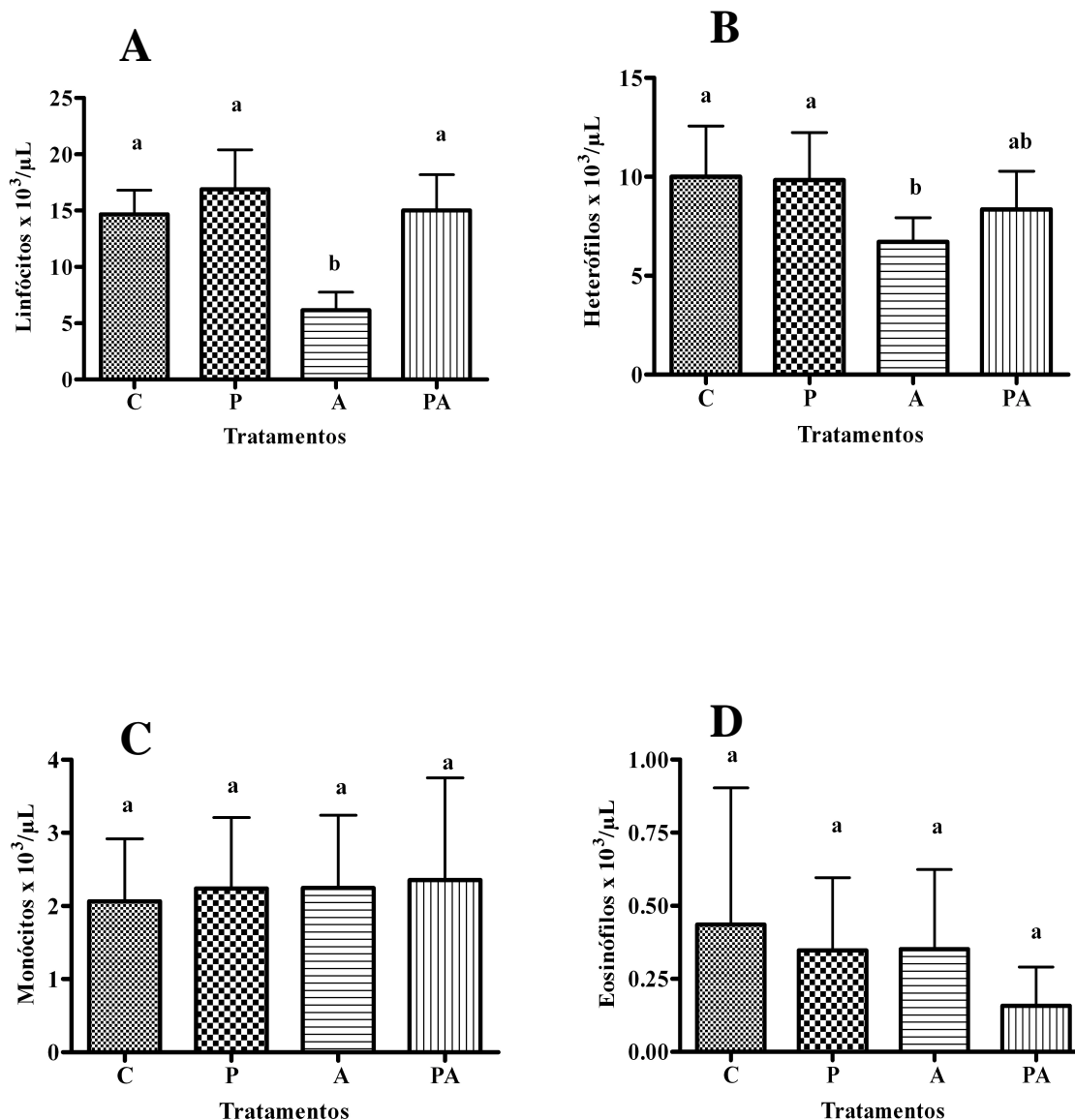


Figura 13. Efeito da piperina (60 ppm) nos valores médios relativos à contagem diferencial dos leucócitos: (A) Linfócitos; (B) Heterófilos; (C) Monócitos; (D) Eosinófilos. Os resultados estão expressos pela média do grupo \pm desvio padrão de 15 animais. A análise estatística para os dados com distribuição normal (linfócitos e heterófilos) foi feita por análise de variância, com as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls; dados sem distribuição normal (eosinófilos e monócitos) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns. ^a Letras diferentes indicam diferença estatística, com $p < 0,05$.

4.2.4 Pesquisa de anticorpos específicos para o vírus da doença de Newcastle

A pesquisa de anticorpos vacinais para o vírus da doença de Newcastle foi realizada através da detecção de anticorpos totais e protetores pelos testes de ELISA e HI, respectivamente.

Os frangos de corte imunizados com a vacina para o vírus da doença de Newcastle apresentaram elevação do título de anticorpos totais em todos os grupos, ao final do experimento. Sendo assim, não foi detectada a diminuição da resposta vacinal nos frangos de corte intoxicados com AFB₁, através do teste de ELISA, após a primeira e segunda dose de vacina (**Figura 14 A**).

A pesquisa de anticorpos protetores também mostrou aumento significativo da média geométrica dos títulos pelo teste de HI, após a primeira e segunda dose da vacina (**Figura 14 B**). Entretanto, houve uma diminuição na produção de anticorpos protetores, no grupo de aves intoxicadas com AFB₁, embora a diferença das médias dos títulos entre os grupos experimentais não tenha sido significativa (**Figura 14 B**). A administração de piperina na ração das aves foi capaz de aumentar os títulos vacinais, embora não significativamente, quando comparado com o grupo controle e, tal efeito foi observado até mesmo no grupo de frangos de corte intoxicados com AFB₁ que receberam a piperina. Sendo assim, a piperina misturada à ração promoveu boa resposta de anticorpos protetores, impedindo os efeitos supressores da AFB₁ sobre a resposta vacinal (**Figura 14 B**).

A **Tabela 5** mostra o aumento médio dos títulos de anticorpos protetores em cada grupo experimental, evidenciando-se claramente a diminuição da capacidade de produção dos anticorpos protetores nos frangos intoxicados por AFB₁ e, a capacidade da piperina de impedir tal diminuição causada pela AFB₁. Os animais não intoxicados que receberam ração com 60 ppm de piperina apresentaram aumento dos anticorpos protetores superior ao grupo controle e igual ao grupo de animais que receberam piperina + AFB₁.

Tabela 5. Aumento das médias geométricas dos títulos de anticorpos protetores pelo teste de Inibição da hemaglutinação nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Pós-imunização (1ª dose)	
	19 dias	26 dias
Controle	5,0*	12,0
Piperina	5,7	16,9
AFB ₁	4,6	9,9
Piperina + AFB ₁	10,7	16,4

* Considera-se significativo o aumento da média geométrica do título $\geq 4x$.

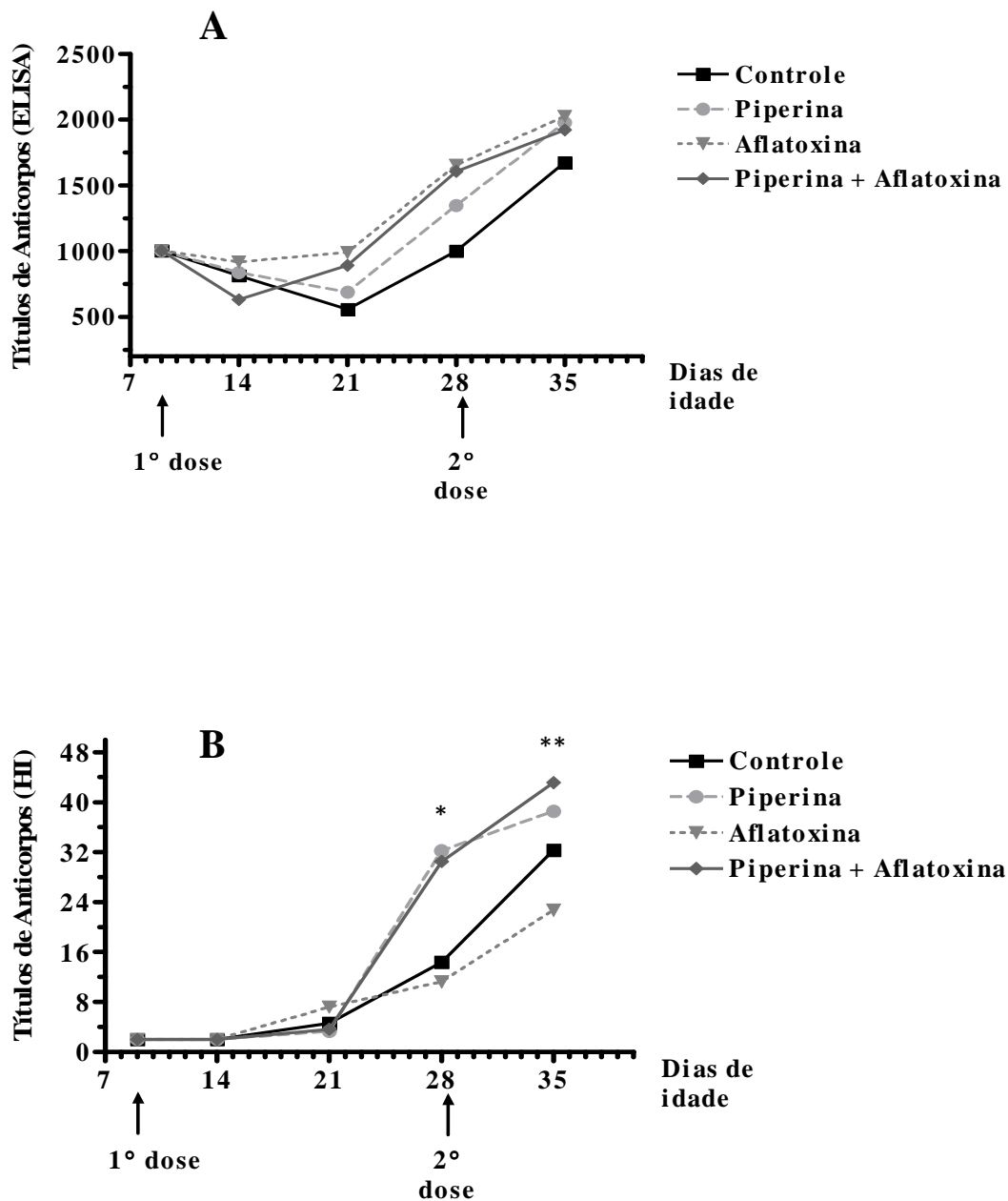


Figura 14. Títulos de Anticorpos vacinais para a doença de Newcastle testados por ELISA (A) e pelo teste de Inibição da hemaglutinação (HI). A primeira e segunda dose da vacina foi feita aos 9 dias e aos 28 dias de idade, indicados pelas setas. * indica diferença significativa entre os títulos vacinais aos 9 dias de idade e o título vacinal aos 28 dias de idade (todos os grupos). ** indica diferença significativa entre os títulos vacinais aos 9 dias de idade e o título vacinal aos 35 dias de idade (todos os grupos). Os dados, sem distribuição normal, foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com as médias comparadas pelo teste de Dunns, com $p < 0,05$. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

Aflatoxicose é uma intoxicação resultante da ingestão da aflatoxina a partir de alimentos e rações contaminadas. Dos tipos de aflatoxinas existentes, o tipo B₁ (AFB₁) é geralmente predominante e também o mais tóxico, tendo como primeiro órgão alvo o fígado (SANTURIO, 2000; TESSARI et al., 2005). O metabolismo hepático tem importante papel na determinação da toxicidade das aflatoxinas, servindo como parâmetro de intoxicação. Desta forma, alterações como: aumento do tamanho e peso do fígado, alterações na coloração e no seu aspecto macroscópico e, alteração das enzimas hepáticas, são bem evidenciados em animais intoxicados (ORSI et al., 2007; MEISSONNIER et al., 2007; YENER et al., 2009). Outros parâmetros, como inibição do crescimento e da eficiência alimentar, diminuição da produção de ovos, sensibilidade aumentada às machucaduras e, inibição dos mecanismos de resistência da imunidade, são atribuídos à intoxicação de aves por aflatoxinas (CRUZ, 1995).

O primeiro objetivo do presente estudo foi verificar se a concentração de AFB₁ (0,5 mg/kg peso corpóreo/gavagem) empregada reproduzia os efeitos tóxicos característicos de intoxicação por essa micotoxina. Para tal, foi avaliado o ganho médio de peso de frangos de corte intoxicados com AFB₁, além do aspecto macroscópico e peso relativo do fígado, dosagem de enzimas hepáticas AST e GGT, e verificação da frequência de PCE e pesquisa de micronúcleos.

A concentração de 0,5 mg de AFB₁/ kg, administrada diariamente, por via oral, equivale à administração de 2-3 ppm de AFB₁ na ração. Segundo a literatura, a contaminação de ração nessa faixa é capaz de causar intoxicação, com observação dos efeitos descritos acima (ORTATALI; OGUZ, 2001; VALDÍVIA et al., 2001). Como esperado, a intoxicação dos frangos de corte com AFB₁ por 25 dias promoveu diminuição significativa ($p < 0,05$) do ganho médio de peso, aumento significativo ($p < 0,05$) do peso relativo do fígado, apresentando aspecto pálido e coloração amarelada.

Aparentemente, as duas mortes obtidas nos grupos de animais que receberam AFB₁ por gavagem estão relacionadas à intoxicação pela micotoxina devido aos resultados obtidos na necropsia dos fígados, que apresentaram aspecto friável e coloração pálida.

Shareef et al. (2008) verificaram que a mortalidade de frangos de corte estava diretamente relacionada ao aumento da concentração de aflatoxinas. Assim como no presente estudo, a necropsia dos animais mortos revelou que o fígado foi o principal órgão afetado, sugerindo alterações características de aflatoxicose no tamanho e na coloração do fígado (palidez e coloração amarelada).

A diminuição do ganho de peso é uma característica sempre presente nas aflatoxicoses. Shareef et al. (2008) verificaram que a média do peso vivo diminuiu, proporcionalmente, cerca de 100g de peso vivo para cada 100 ppb a mais de aflatoxinas na ração.

Além da diminuição do ganho de peso de frangos de corte intoxicados experimentalmente com AFB₁ (3mg/kg de ração e 1 ppm na ração, respectivamente), Valdivia et al. (2001) e Gowda et al. (2009) observaram aumento do índice de conversão alimentar, caracterizando diminuição da eficiência alimentar. Essa característica pode ser explicada pela capacidade da AFB₁ agir como inibidor competitivo de enzimas proteases serina, como a tripsina. Essa enzima tem um papel central na digestão, sendo responsável pela ativação de enzimas, tais como quimi tripsina, carboxipeptidase B e de várias lipases e amilases. Sua inibição leva a uma falha na digestão, diminuindo, a disponibilidade de nutrientes ao organismo (CUCCIOLONI et al., 2009).

As alterações de peso e aspecto macroscópico do fígado observadas no presente estudo, estão de acordo com Espada et al. (1992) que, através da intoxicação oral de frangos de corte com AFB₁, por 21 dias, nas doses de 0,2 µg/g e 3,0 µg/g de peso corporal, também observaram alteração de coloração do fígado (coloração amarelada) e aumento significativo do peso bruto desse órgão. Da mesma forma, Özen et al. (2009) verificaram que alimentação de frangos de corte com 150 e 300 ppb de AFB₁ promoveu alterações no fígado, tornando-se mais friável, pálido e amarelado.

A ação da AFB₁ sobre o fígado promove lesões extensivas nos hepatócitos, com liberação de enzimas hepáticas importantes no sangue periférico aumentando suas concentrações no soro (MOTTA, 2003). Segundo Schmitd et al. (2007), o aumento significativo da enzima AST em aves sugere lesão hepática grave e difusa, bem como distúrbios musculares. No entanto, altos níveis de AST são sugestivos de dano hepático severo. Desta forma, Schmitd et al. (2007), consideram a enzima AST como um marcador sensível, mas não específico, de dano hepático.

A GGT é outra enzima que, em nível elevado no sangue, indica lesão hepática ativa em frangos de corte. A elevação dos níveis sanguíneos de GGT, segundo Kaneko (1989), indica colestase biliar e hiperplasia de ductos, alterações comprovadamente provocadas pelas aflatoxinas (BORSA et al., 1998).

Borsa et al. (1998), em seus estudos sobre a função de enzimas hepáticas na aflatoxicose aguda, verificaram que a detecção da hepatotoxicidade pode ser feita através do monitoramento dos níveis das enzimas AST e GGT no soro de frangos de corte com faixa etária entre 21 e 42 dias.

No presente estudo houve aumento significativo destas enzimas no grupo tratado com AFB₁. Estes achados também estão de acordo os resultados de Bintvihok e Kositcharoenkul (2006) que observaram aumento significativo dos níveis séricos das enzimas AST e GGT em frangos de corte intoxicados com AFB₁ (50 e 100 ppb). Da mesma forma, Tessari et al. (2005) durante a intoxicação por AFB₁ (200 µg/kg de ração), por 41 dias, detectaram um aumento significativo da enzima AST em frangos de corte. Pozzi et al. (2000) também encontraram níveis significativamente aumentados de AST e GGT em ratos Winstar intoxicados por AFB₁ (72 µg AFB₁/100g de peso corporal), através de gavagem.

Os resultados obtidos em relação às alterações hepáticas, como aspecto/peso do fígado e a quantificação de AST e GGT, indicam que houve lesão hepática, e que estas são compatíveis com as características descritas para intoxicação por AFB₁, citadas na literatura, indicando que a dose utilizada (0,5 mg/kg de peso corporal) foi suficiente para causar intoxicação.

Além da análise da capacidade hepatotóxica da concentração de AFB₁ (0,5 mg/Kg), também foi avaliada sua capacidade citotóxica para medula óssea, através da frequência de eritrócitos imaturos (PCE) no sangue periférico e sua capacidade de promover danos cromossômicos, através da pesquisa de micronúcleos nos eritrócitos dos frangos de corte intoxicados.

Segundo Ribeiro et al. (2003) o efeito tóxico de um xenobiótico sobre a medula óssea pode ser avaliada pela diminuição da frequência de PCE, indicando falha na produção de eritrócitos. No presente estudo, a frequência de PCE no sangue periférico das aves intoxicadas com AFB₁, foi 3,8 vezes menor que a encontrada no grupo controle, evidenciando-se, mais uma vez, a capacidade citotóxica da AFB₁ na concentração empregada.

Em camundongos, a toxicidade da medula óssea está associada, geralmente, com a depressão medular de eritrócitos em torno de 80% ou mais do valor do controle (RIBEIRO et al., 2003). Embora não existam dados na literatura para tal análise em frangos de corte, o

mesmo cálculo nos dá o que seria uma depressão medular de 73,6 % no grupo da AFB₁, indicando um possível efeito tóxico medular.

A formação de micronúcleos tem sido amplamente empregada na epidemiologia molecular, como um biomarcador dos danos cromossômicos e da instabilidade do genoma, sendo aplicada como teste de genotoxicidade em animais intoxicados por xenobióticos (IAMARCOVAI et al., 2007; BOLOGNESI et al., 2006).

Micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros deixados para trás durante a anáfase. A quantificação dos micronúcleos permite a detecção de danos cromossômicos tanto por perda de cromossomos, como pela sua quebra. O teste do micronúcleo determina efeitos genotóxicos e pode ser utilizado, não somente para a detecção de danos genéticos agudos, mas também de danos crônicos (FENECH, 2000).

Segundo Udroui (2006), a análise de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico é indicada para condições onde há exposição crônica a um produto genotóxico. Neste sentido, a quantificação do micronúcleo em eritrócitos normocromáticos informa eventos genotóxicos que ocorreram em um tempo igual ao tempo de vida dos eritrócitos circulantes. Portanto, o aumento significativo de micronúcleos, em eritrócitos normocromáticos, no grupo de frangos de corte tratado com AFB₁ indica um efeito genotóxico crônico.

Após verificação dos efeitos citotóxicos da AFB₁ na concentração empregada no estudo, foi verificado o efeito imunotóxico da micotoxina e a capacidade da piperina, amida natural extraída da pimenta-do-reino, impedir esse efeito.

Os efeitos negativos das aflatoxicoses são mais sentidos em frangos de corte e galinhas de postura, sendo intimamente relacionados à imunossupressão. Em nosso estudo, observamos diminuição significativa do peso relativo do timo nas aves intoxicadas com AFB₁ (grupo A), além da visualização de petéquias no órgão, enquanto a bursa de Fabrício e o baço não mostraram alterações macroscópicas visíveis. De forma semelhante, Kumar et al. (2003) observaram que a ingestão de AFB₁ (0,5 ppm) misturada à ração promoveu diminuição do peso do timo e da bursa de Fabrício e aumento do peso do baço. Ortatatli e Oguz (2001) também evidenciaram atrofia do timo e da bursa de Fabrício em frangos de corte intoxicados com 2,5 mg de aflatoxinas/kg, por 21 dias.

A análise histopatológica do timo das aves intoxicadas em nosso estudo revelou congestão acentuada, necrose, mineralização e depleção de linfócitos moderadas, e hemorragia e fibrose leves, compatível com as lesões tímicas observadas por Kumar et al. 2003. Contudo, as lesões normalmente descritas para a bursa e o baço como, depleção de linfócitos e hemorragia (KUMAR et al., 2003; ORTATALI; OGUZ, 2001; ORTATALI et al., 2005), não foram observadas.

A ação tóxica da AFB₁ sobre o timo se refletiu claramente na leucopenia observada, associada à diminuição significativa dos linfócitos circulantes. Esses resultados estão de acordo com Oguz et al. (2000) que também observaram diminuição na contagem de linfócitos na intoxicação de frangos de corte por AFB₁ (2,5 mg/kg de ração). No presente estudo também foi evidenciada a diminuição significativa do número de heterófilos, concordando com os resultados descrito por Hashem e Mohamed (2009) em frangos de corte intoxicados com 4mg/kg ração de AFB₁. Segundo esses autores, o decréscimo da contagem total de leucócitos, linfócitos e heterófilos, pode ser devido ao efeito tóxico da micotoxina sobre as células circulantes, seqüestro das células em tecidos e/ou efeito da AFB₁ sobre a medula óssea e tecidos linfóides.

Na literatura, existem diversos trabalhos mostrando a ação da AFB₁ sobre a resposta imune mediada por células. Estes efeitos foram descrito em frangos de corte intoxicados com 0,3 e 1,0 mg de AFB₁/kg de ração, por Ghosh et al. (1991). Os autores observaram

diminuição da resposta imune celular através da contagem total de leucócitos e diferencial de linfócitos sanguíneos, teste de sensibilidade de pele ao 2,4-dinitrofluorobenzeno e reação de enxerto pelo hospedeiro, além de diminuição da atividade de macrófagos esplênicos. Além disso, Jiang et al. (2005) observaram em humanos a diminuição da ativação de células T e B, além de uma diminuição significativa dos níveis de perforinas e granzinas em linfócitos TCD8+.

No presente estudo, o emprego de 60 ppm de piperina misturada à ração impediu os efeitos imunotóxicos da AFB₁ reduzindo, de modo significativo ($p < 0,05$), a atrofia tímica, as lesões identificadas nesse órgão linfóide, bem como a diminuição dos linfócitos e heterófilos do sangue.

O efeito imunoprotetor da piperina foi observado por Pathak e Khandelwal (2009) em camundongos intoxicados por cádmio. Os autores descreveram uma diminuição das lesões observadas no timo e no baço dos animais intoxicados, através da administração oral de piperina na concentração de 2,5 mg/kg/dia, por 7 dias. Além disso, o mesmo estudo evidenciou o efeito antiapoptótico e antioxidante da piperina, auxiliando na restauração da morfologia dos órgãos linfóides avaliados.

A piperina possui reconhecida propriedade citoprotetora, demonstrada por sua capacidade antioxidativa, antiapoptótica e de restauração de células com respostas mitogênicas proliferativas, sugerindo seu uso terapêutico em condições de comprometimento do sistema imunológico.

A AFB₁ exerce seu efeito, principalmente sobre a resposta imune mediada por células (CAST, 2003; MEISSONNIER et al., 2008), sendo seu efeito sobre a resposta imune humoral controverso. Segundo Meissonnier et al. (2008), as aflatoxinas tem efeito moderado sobre a resposta imune humoral.

No presente estudo a administração oral de 0,5 mg de AFB₁/kg de peso corpóreo não foi capaz de comprometer, de modo significativo, a resposta vacinal para o vírus da doença de Newcastle. Apesar de ter havido um aumento do título de anticorpos pelo teste de Inibição da hemaglutinação, entre o início e o final do experimento nos animais que receberam apenas AFB₁, quando se compara a resposta vacinal entre os grupos estudados, pode-se observar que houve uma diminuição, embora não significativa, entre o grupo que recebeu AFB₁ e os outros grupos. É importante ressaltar que o grupo de animais não intoxicados que receberam piperina apresentaram aumento no título de anticorpos protetores (16,9 vezes) superior ao observado no grupo controle (12 vezes) e semelhante ao grupo de animais intoxicados que receberam piperina (16,4 vezes).

Diversos estudos realizados em diferentes espécies animais (suínos, coelhos, ratos e galinhas) expostos a AFB₁ também mostraram o não comprometimento da resposta imune humoral específica após vacinação ou sensibilização (PANANGALA et al., 1986; WATZL et al., 1999, MARIN et al., 2002). Turner et al. (2003) também falharam em demonstrar, em humanos, correlação entre o nível de aductos albumina-aflatoxina e título de anticorpos para antígenos do vírus rábico ou antígenos de pneumococos. Meissonnier et al. (2008), não observaram alteração na concentração plasmática de anticorpos IgG anti-ovalbumina em suínos expostos a dieta com AFB₁.

Contraditoriamente, Qureshi et al. (1998) observaram diferença significativa na titulação de anticorpos contra hemácias de carneiro em pintos provenientes de galinhas intoxicadas, a partir da dose de 0,2 mg de AFB₁/kg de ração. O mesmo efeito foi visualizado para anticorpos anti-*Brucella abortus*, a partir da dose de 5 mg de AFB₁/kg de ração. Kumar et al. (2003) também observaram diminuição da concentração de anticorpos anti-vírus da doença de Newcastle no soro de frangos de corte vacinados e intoxicados com 0,5 ppm de

AFB₁. Desta forma pode-se sugerir o que a capacidade da AFB₁ em diminuir a resposta vacinal depende de vários fatores como a espécie, o tempo de intoxicação bem como a concentração da toxina.

Diversas abordagens vêm sendo pesquisadas visando redução ou inativação das aflatoxinas. O emprego de substâncias antioxidantes é um dos pontos de interesse, uma vez que as aflatoxinas medeiam diversos efeitos deletérios sobre tecidos através da indução de estresse oxidativo (SHEN et al., 1994, 1996). Verduras, como repolho (WHITTY; BJELDANES, 1987), brócolis (RAMSDELL; EATON 1988) e couve de Bruxelas (SALBE; BJELDANES, 1987), empregadas na alimentação de ratos, ou o emprego de extratos alcoólicos de alho, repolho e cebola (ABDEL-WAHHAB; ALY et al., 2003), demonstram potencial na prevenção da toxicidade induzida pelas aflatoxinas e geração de radicais livres em ratos. Além disso, estudo conduzido com óleo obtido a partir de sementes da *Urtiga dióica* L. também indicam a capacidade de promover efeito hepatoprotetor em ratos intoxicados com aflatoxinas por 90 dias, por sua capacidade antioxidante (YENER et al., 2009).

Desta forma, é possível sugerir que produtos antioxidantes, tal como a piperina, sejam capazes de diminuir efeitos tóxicos causados pela AFB₁. No presente estudo pôde-se observar que a piperina na concentração de 60 ppm diminuiu os efeitos imunotóxicos causados pela concentração de 0,5 mg AFB₁/kg de peso corporal, evidenciando uma melhora nos parâmetros estudados em relação ao sistema imune. Portanto, pode-se sugerir que a piperina foi capaz de diminuir os efeitos imunotóxicos da AFB₁ nas concentrações utilizadas. Entretanto, algumas dúvidas ainda persistem e necessitam de aprofundamento no que diz respeito aos conhecimentos sobre modo de ação da piperina e da sua ação direta sobre o sistema imune, bem como, a ação da AFB₁ sobre do sistema imune humoral.

6 CONCLUSÃO

A concentração de AFB₁ utilizada (0,5 mg/kg de peso corporal) foi capaz de causar alterações no ganho de peso, bem como alterações hepatóxicas, genotóxicas e toxicidade medular nos frangos de corte, características da intoxicação por AFB₁. Da mesma forma, a concentração de AFB₁ utilizada causou alterações negativas nos parâmetros estudados relacionados ao sistema imune.

Por outro lado, a piperina misturada à ração dos frangos de corte não causou lesão aparente nos tecidos linfóides, nem mesmo variações nas concentrações das células imunes estudadas. Além disso, a piperina foi capaz de induzir aumento do título de anticorpos vacinais protetores, sugerindo aparente capacidade imunoestimulante.

A administração concomitante de piperina na ração dos frangos intoxicados por AFB₁ foi capaz de diminuir ou impedir as lesões histológicas no timo e baço, além de restaurar as contagens total e diferencial de leucócitos.

Embora não tenha havido diferença significativa na quantificação de anticorpos vacinais, os frangos de corte intoxicados com AFB₁ (0,5mg/kg) e alimentados com ração contendo 60 ppm de piperina apresentaram uma tendência de recuperação dos títulos de anticorpos protetores (HI), quando comparados aos animais intoxicados que não receberam piperina misturada à ração.

Sendo assim, podemos concluir que a concentração de AFB₁ utilizada foi capaz de causar intoxicação e alterações no sistema imune. Bem como, a piperina adicionada à ração na concentração de 60 ppm, foi capaz de exercer um efeito protetor sobre os parâmetros estudados, em frangos intoxicados experimentalmente com AFB₁ na concentração de 0,5 mg/kg de peso corporal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHHAB, M. A.; ALY, S. E. Antioxidants and Radical Scavenging Properties of Vegetable Extracts in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 2409–2414, 2003.

ALTUG, T.; YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Degradation of aflatoxin B1 in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, v.53, p.581-582, 1990.

ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; DA CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C.; GRAY, A. I. Piperdardina, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.44, n.3, p. 559-561, 1997.

AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; ROGERS, H. S.; KIESZAK, S.; NJAPAU, H.; SCHLEICHER, R.; MCCOY, L. F.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C.; SLUTSKER, L. Case–Control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n. 12, 2005.

BAYMAN, P.; BAKER, J.L.; MAHONEY, N.E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, p. 161–169, 2002.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart. Ed. da Universidade de São Paulo, 1976. 257 p.

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p.265–282, 2007.

BINTVIHOK, A; KOSITCHAROENKUL, S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1. **Toxicon**, v. 47, p. 41–46, 2006.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v.78, p. 93–98, 2006.

BORSA, A.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M. Enzimas de função hepática na aflatoxicose aguda experimental em frangos de corte. **Ciência Rural**, v.28, p.587-590, 1998.

BRASIL. Portaria da Secretaria de Defesa Agropecuária n183, 8 de novembro de 1994. Aprova Normas Técnicas para o Controle e Erradicação da Doença de Newcastle. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 nov. 1994. Seção 1. p. 17625.

BUERGELT, C.D. 1997: **Color Atlas of Reproductive Pathology of Domestic Animals**. Mosby, New York, p. 219–220.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, n. 438. p.155-161, 1999.

CARDOSO, V. S.; LIMA, C. A. R.; LIMA, M. E. F.; DORNELES, L. E. G. ; LEIRA FILHO, W. T; LISBOA, R. S.; GUEDES JUNIOR, D. S.; DIREITO, G. M. ; DANELLI, M. G. M. . Administração oral de piperina em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1521-1526, 2009.

CAST, 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and humans. In Richard J.L, Payne, G.A. (Eds.), **Council of Agricultural Science and Technology (CAST) Task Force Report No. 139**, Ames, Iowa, p. 199.

CELIK, A.; CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA. Citogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*, 18, p. 417-421, 2003

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.

CUCCIOLONI, M.; MOZZICAFREDDO, M.; BAROCCI, S.; CIUTI, F.; RE, L.; ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M. Aflatoxin B₁ misregulates the activity of serine proteases: Possible implications in the toxicity of some mycotoxins. **Toxicology in Vitro**, v.23, n. 3, p. 393-399, 2009.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, p.179–184, 1997.

DENLI, M.; OKAN, F. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B₁ in broiler diets. **South African Journal of Animal Science**, v.36, n.4, p. 222-228, 2006.

DOGRA, R. K.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 229-236, 2004.

ESPADA, Y.; DOMINGO, M.; GOMEZ, J.; CALVO, M. A. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B₁ in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.53, p. 275-279, 1992.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG. W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n.1-2, p. 29-36, 1985.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROCHA ROSA, C. A. da. Potential Aflatoxin and Ochratoxin A Production by *Aspergillus* Species in Poultry Feed Processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 343–353, 2007.

GAGINI, T. B.; SILVA, R. E.; CASTRO, I. S.; SOARES, B. A.; LIMA, M. E. F.; BRITO, M. F.; MAZUR, C.; DIREITO, G. M.; DANELLI, M. G. M. Oral administration of piperine for the control of aflatoxin intoxication in rats. **Brazilian journal of microbiology**. No prelo

GALLAGHER, E. P.; WIENKERS, L. C.; STAPLETON, P. L.; KUNZE, K. L.; EATON, D. L. Role of Human Microsomal and Human Complementary DNA-expressed Cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the Bioactivation of Aflatoxin. **Cancer Research**, v.54, p. 101-108, 1994.

GHANEM, I; ORFI, M.; SHAMMA, M. Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B₁ in food and feed crops. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.4, p. 787-791, 2008.

GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H.V.S.; JHA, G.J. Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B₁ in broiler chicks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 28, n.2, p.165-172, 1991.

GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; PANANGALA, V. S.; HOERR, F. J. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. **Poultry Science**, v.64, n.9, p.1678-1684, 1985.

GOWDA, N. K. S.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; CHEN, Y. C. Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B₁. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p.1629–1634, 2009.

GOYNES, W. R.; LEE, L. S. *Aspergillus flavus* infection of developing cottonseed: Microscopical determination of mycelial progression and associated aflatoxin formation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, n.3, p. 421-428, 1989.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**. n. 518, p. 145-150, 2002.

HASHEM, M. A.; MOHAMED, M. H. Hemato-biochemical and pathological studies on aflatoxicosis and treatment of broiler chicks in Egypt. **Veterinaria Italiana**, v.45, n.2, 323-337, 2009.

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

IAMARCOVAI, G.; BOTTA, A.; ORSIÉRE, T. Number of centromeric signals on micronuclei and mechanisms of aneuploidy. **Toxicology Letter**, v.166, p.1-10, 2007.

IBRAHIM, I. K.; SHAREEF, A. M.; AL-JOUBORY, K. M. T. Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 119–122, 2000.

IKAN, R. In Natural Products. A Laboratory Guide 2^a. ed. **New York Academic Press.**, p. 233-238, 1991.

JIANG, Y. ; JOLLY, P. E.; ELLIS, W. O.; WANG, J; PHILLIPS, T. D. ; WILLIAMS, J. H. Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. **International Immunology**, v. 17, n. 6, p. 807–814, 2005.

KANEKO, J. J. Appendixes. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1989. p.877-901.

KIM, S. H.; LEE, Y. C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 353-359, 2009.

KOUL, I. B.; KAPIL, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. **Planta Medica**, v.59, n.5, p. 413-417, 1993.

KUMAR, P. A.; SATYANARAYANA, M. L.; VIJAYASARATHI, S.K.; GOWDA, R. N. S.; RAO, S. Pathology of lymphoid organs in aflatoxicosis and ochratoxicosis and immunomodulatory effects of vitamin E and Selenium in broiler chicken. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v.27, n.2, p.102-106, 2003.

LEE, C. S.; HAN, E. S.; KIM, Y. K. Piperine inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v.537, p.37–44, 2006.

MARIANI, GVC. **Efeito de aflatoxinas sobre o desempenho produtivo de frangos de corte em diferentes períodos de desenvolvimento corporal**. [Dissertação]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 1998.

MARIN, D. E.; TARANU, I. ; BANACIU, R. P.; PASCALE, F.;TUDOR, D. S. ; AVRAM, N.; SARCA, M. CUREU, I.; CRISTE, R. D., SUTA, V. OSWALD, I. P. Changes in performance, blood parameters and cellular immune response in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxina. **Journal of animal science**, v.80, p.1250-1257, 2002.

MCLEAN, M.; DUTTON, M. F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 65, p. 163-192, 1995.

MEISSONNIER, G. M.; LAFFITTE, J.; LOISEAU, N.; BENOIT, E.; RAYMOND, I.; PINTON, P.; COSSALTER, ANNE-MARIE; BERTIN, G.; OSWALD, I. P.; GALTIER, P. Selective impairment of drug-metabolizing enzymes in pig liver during subchronic dietary exposure to aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2145-2154, 2007.

MEISSONNIER, G. M.; PINTON, P.; LAFFITTE, J.; COSSALTER, A.; GONG, Y. Y.; WILD, C. P.; BERTIN, G.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Immunotoxicity of aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, p. 142–149, 2008.

MEYER, U. Overview of enzymes of drug metabolism. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v.24, p. 449-459, 1996.

MOTTA, V.T. Enzimas. In: **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. p. 90-120.

NAFFETI, A.; SKANDRANI, I.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; GHEDIRAA, K.; CHEKIR-GHEDIRAA, L. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p. 1-10, 2008.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v.31, p.735-738, 1951.

OGUZ, H.; KEÇEÇI, T.; BIRDANE, Y. O.; ÖNDER, F.; KURTOĞLU, V. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 89–93, 2000.

ORSI, R.B.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; CORRÊA, B. Effects of oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, p. 201–208, 2007.

ORTATATLI, M.; OGUZ, H.; Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science**, v. 71, p. 59-66, 2001.

ORTATATLI, M.; OGUZ, H.; HATIPOĞLU, F.; KARAMAN, M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100ppb) and clinoptilolite exposure. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 61–68, 2005.

ÖZEN, H.; KARAMAN, M.; ÇİGREMİS, Y.; TUZCU, M.; ÖZCAN, K.; ERDAG, D. Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. **Research in Veterinary Science**, v.86, p. 485–489, 2009.

PANANGALA, V. S.; GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; HOERR, F. J.; MITRA, A.; SCHULTZ, R. D.; WILT, G. R. Effects of aflatoxin on the growth performance and immune responses of weanling swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 9, p. 2062-2067, 1986.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D. ; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n.4, p.591-673, 1997.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Modulation of cadmium induced alterations in murine thymocytes by piperine: Oxidative stress, apoptosis, phenotyping and blastogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 486 – 497, 2006.

PATHAK N.; KHANDELWAL S. Citoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splenocytes: An *in vitro* study. **European journal of Pharmacology**, v.576, n. 1-3, p.160-170, 2007.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Comparative efficacy of piperine, curcumin and picroliv Against Cd immunotoxicity in mice. **Biometals**, v. 21, p. 649–661, 2008.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Immunomodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p. 52–60, 2009.

PEI, Y. Q. A review of pharmacology and clinical use of piperine and its derivatives. **Epilepsia**, v.24, n.2, p.177-182, 1983.

POZZI, C. R.; CORRÊA, B.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; ORSI, R. B.; MATARAZZO, S.V. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. **Mycopathologia**, v. 151, p. 21–27, 2000.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells in mice. **Clinical and Experimental Metastasis**, v.19, n.8, p.703-708, 2002.

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 8, p.2762–2764, 2007.

QURESHI, M. A.; BRAKE, J.; HAMILTON, P. B.; HAGLER, JR. W. M.; NESHEIM, S. Dietary Exposure of Broiler Breeders to Aflatoxin Results in Immune Dysfunction in Progeny Chicks. **Poultry Science**, v. 77, p.812–819, 1998.

RAMSDELL, H. S., EATON, D. L. Modification of aflatoxin B1 biotransformation in vitro and DNA binding in vivo by dietary broccoli in rats. **Journal of Toxicology Environmental Health**, v.25, n.3, p.269-84, 1988.

REEN, R. K.; WIEBEL, F. J.; SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 165 -173, 1997.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. 2003. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356p.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.3–10, 2007.

ROSTAGNO, H. S. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2ª ed. Viçosa, Minas Gerais – Brasil, 2005.

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

SABINO, M.; MILANEZ, T. V.; LAMARDO, L. C. A.; INOMATA, E. I.; ZORZETTO, M. A. P.; NAVAS, S.A.; STOFER, M. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.85-88, 1999.

SALBE, A. D.; BJELDANES, L. F. Effect of diet and route of administration on the DNA binding of aflatoxin B₁ in the rat. **Carcinogenesis**, v.10, n.4, 629-634, 1987.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, 2000.

SCHMITD, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILO, A. C. Patologia clínica em aves de produção- uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola-Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n.3, p.9-20, 2007.

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Oral supplementation of piperine leads to altered phase II enzymes and reduced DNA damage and DNA-protein cross links in benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis. **Molecular and cellular biochemistry**, v.268, n.1-2, p.141-147, 2005a.

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinica Chimica Acta**, v.350, p. 73–78, 2004.

SELVENDIRAN, K.; SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p. 264–267. 2004.

SELVENDIRAN, K.; THIRUNAVUKKARASU, C.; SINGH, J. P.; PADMAVATHI, R.; SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on mitochondrial TCA cycles and phase-I and GSH-metabolizing enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Molecular and cellular biochemistry**. v.271, n.1-2, p.101-106, 2005 b.

SHAREEF, A. M.; BAYON, O. S.; QUBIH, T. S. Correlation between broiler aflatoxicosis and European production efficiency factor. **Iraqi Journal of Veterinary Science**, v.22, n.1, p. 49-55, 2008.

SHEN, H. M.; SHI, C. Y.; LEE, H. P.; ONG, C. N. Aflatoxin B₁-Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 127, n. 1, p. 145-150, 1994.

SHEN, H.; SHI, C.; SHEN, Y.; ONG, C. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 2, p.139-146, 1996.

SIDDIQUI, B. S. et al. An amide from fruits of Piper nigrum. **Phytochemistry**, v.45, n.8, p. 1617-1619, 1997.

SINGH, J.; REEN, R. K.; WIEBEL, F. J. Piperine, a major ingredient of black and long peppers, protects against AFB₁-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells. **Cancer Letters**, v. 86, n. 2, p.195-200, 1994.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenona and sterigmatocystin in some Brazilian foods by multitoxin thin layer chromatographic method. **Journal of the Association of Analytical Chemists**, v. 72, p. 22-26, 1989.

SOTOMAYOR, R. E.; WASHINGTON, M.; NGUYEN, L.; NYANG'ANYI, R.; HINTON, D. M.; CHOU, M. Effects of Intermittent Exposure to Aflatoxin B1 on DNA and RNA Adduct Formation in Rat Liver: Dose-Response and Temporal Patterns. **Toxicological Sciences**, v.73, p. 329–338, 2003.

SPENSLEY, P. C. Aflatoxin, the active principle in Turkey 'X' disease. **Endeavour**, v. 22, n.86, p. 75-79, 1963.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 735–748, 2007.

STICH, H.F.; SAN, R.H.; ROSIN, M.P. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cells. **Am NY Acad. Sci**, 407, p. 93-105, 1983.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn.and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p 339–346, 2004.

SUZUKI, Y.; NAGAE, Y.; LI, J.; SABAKA, H.; MAZOWA, K.; TAKAHASHI, A.; SHIMUZU, H. The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). **Mutagenesis**, n. 4, p. 420–424, 1989.

SZCZECH, G.M. Alimentary Toxic Aluekia:fetal brain necrosis, and renal tubular necrosis. **American Journal of Pathology**, v.91, n. 3, p.689-692, 1978.

TESSARI, E.N.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; CARDOSO, A.L.S.P.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Efeitos da aflatoxina b1 e fumonisina b1 sobre os níveis séricos de Aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. **Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo**, v.72, n.2, p.185-189, 2005.

THEUMER, M. G.; LÓPEZ, A. G.; MASI, D. T.; CHULZE, S. N.; RUBINSTEIN, H. R. Immunobiological effects of AFB₁ and AFB₁-FB₁ mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. **Toxicology**, v.186, p.159-170, 2003.

TURNER, P. C.; MOORE, S. E.; HALL, A. J.; PRENTICE, A. M.; WILD, C. P. Modification of Immune Function through Exposure to Dietary Aflatoxin in Gambian Children. **Environmental Health Perspectives**, v.111, n. 2, p. 217-220, 2003.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 201-204, 2006.

VALDIVIA, A. G.; MARTÍNEZ, A.; DAMIÁN, F. J.; QUEZADA, T.; ORTÍZ, R. MARTÍNEZ, C.; LLAMAS, J.; RODRÍGUEZ, M. L.; YAMAMOTO, L.; JARAMILLO, F.; LOARCA-PIÑA, M. G.; REYES J. L. Efficacy of N-Acetylcysteine to Reduce the Effects of Aflatoxin B1 Intoxication in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 80, p. 727-734, 2001.

WANGIKAR, P.B.; DWIVEDI, P.; SINHA, N.; SHARMA, A.K. ; TELANG, A.G. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁ with special reference to microscopic effects. **Toxicology**, v.215, n. 1-2, p. 37-47, 2005.

WATZL, B.; NEUDECKER, C.; HÄNSCH, G. M.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Short-term moderate aflatoxin B₁ exposure has only minor effects on the gut-associated lymphoid tissue of Brown Norway rats. **Toxicology**, v. 138, n. 2, p.93-102, 1999.

WHITTY, J. P.; BJELDANES, L. F. **The effects of dietary cabbage on xenobiotic-metabolizing enzymes and the binding of aflatoxin B1 to hepatic DNA in rats.** Food and Chemical Toxicology, v.25, n.8, p.581-587, 1987.

WILD, C.P.; MONTESANO R. A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. **Cancer Letters**, v.286, n. 1, p. 22-28, 2009.

WYATT, R. D. Poultry. In: Smith JE & Henderson RS, ed. Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1991, p. 553-605.

YENER, Z.; CELIK, I.; ILHAN, F.; BAL, R. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver Pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 418-424, 2009.