



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO GALDINO RICCI

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELA
OCRATOXINA A EM FRANGOS E ANÁLISE DE
TRATAMENTO COM L-TRIPTOFANO**

Londrina
2021

FERNANDO GALDINO RICCI

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELA
OCRATOXINA A EM FRANGOS E ANÁLISE DE
TRATAMENTO COM L-TRIPTOFANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson José Venâncio

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G149a Ricci, Fernando Galdino.

Avaliação de efeitos da intoxicação aguda pela Ocratoxina A em frangos e análise de tratamento com L-triptofano / Fernando Galdino Ricci. - Londrina, 2021.
63 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Coorientador: Emerson José Venâncio.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.

Inclui bibliografia.

1. IgA - Tese. 2. IgY - Tese. 3. Micotoxinas - Tese. 4. Vilosidades - Tese. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Venâncio, Emerson José. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

FERNANDO GALDINO RICCI

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELA
OCRATOXINA A EM FRANGOS E ANÁLISE DE
TRATAMENTO COM L-TRIPTOFANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pelo excelente convívio e os seus ensinamentos.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Emerson José Venâncio, pelo apoio e disponibilização de seu laboratório.

Agradeço também aos meus pais Margarete Galdino e Jefferson Ricci, pelo suporte que me deram durante esse período, e aos meus demais familiares.

À Cinthia Peres, pelo companheirismo, paciência e pelo apoio.

Às Profas. Dras. Karina K. M. C. Flaiban e Ana Paula F. R. L. Bracarense pela disponibilização de seus laboratórios e ao Prof. Dr. Alexandre Oba pela contribuição na realização do experimento.

À Prof. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista, que foi essencial para a realização dos experimentos e coleta de materiais, e a toda sua equipe, principalmente às alunas de residência.

À Prof. Dra. Renata Katsuko Takayama, pelo apoio mesmo antes de ingressar no mestrado, que continua até hoje.

À Prof. Dra. Elisa Yoko Hirooka, por ter feito parte da banca de defesa.

Aos colegas de laboratório e de pós graduação e aos estagiários, pela amizade e pela contribuição nos ensaios, principalmente à Bianca Dorana e à Letícia Terkelli.

Às agências de fomento Capes e CNPq, pelos recursos disponibilizados.

E finalmente à Deus por me permitir a completar essa etapa.

RICCI, Fernando Galdino. **Avaliação de efeitos da intoxicação aguda pela Ocratoxina A em frangos e análise de tratamento com L-triptofano.** 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. que são capazes de contaminar produtos de origem vegetal, muito utilizados na alimentação dos animais. Através da exposição oral, pelo consumo dos alimentos contaminados, a OTA pode afetar vários sistemas dos animais, tais como os sistemas imunológico e gastrointestinal. Os objetivos do presente estudo foram avaliar o impacto da intoxicação pela OTA em pintainhos, e verificar se o tratamento com L-triptofano pode inibir seus efeitos tóxicos. Após a inoculação de uma dose única de OTA (1,4 mg/kg de peso vivo) em frangos de um dia de idade (Cobb 500), no primeiro dia do experimento, foram administradas quatro doses diárias de L-triptofano (100 mg/kg de peso vivo). No 14º dia foram avaliadas as respostas do sistema imunológico sistêmico e local através de quantificação dos níveis de imunoglobulinas A e Y (IgY/IgA) plasmáticas e presentes no conteúdo cecal, níveis de leucócitos totais circulantes, titulação dos anticorpos vacinais maternos contra o Vírus da Doença de Newcastle (NDV) e contagem do número de células IgA positivas (IgA⁺) na mucosa do duodeno, além do impacto na mucosa local com a avaliação da morfometria do duodeno. Adicionalmente, foram avaliados alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos. Para quantificação de IgA/IgY foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de imunocaptura, a revelação das células IgA⁺ por imunohistoquímica, a titulação de anticorpos vacinais por ELISA direto, os níveis de leucócitos totais circulantes por contagem (câmara de Neubauer) e a morfometria do duodeno pela mensuração dos tecidos corados com hematoxilina/eosina. Os níveis de IgA/IgY no conteúdo cecal, o número de células IgA⁺ e a altura das vilosidades e profundidade das criptas do duodeno dos animais contaminados apenas com OTA diminuíram significativamente, assim como os níveis de leucócitos totais circulantes e do hematócrito dos animais contaminados apenas por OTA ($p < 0,05$), o que demonstrou seus efeitos tóxicos na mucosa local e na hematopoiese. O tratamento com L-triptofano foi benéfico para os animais em diversos parâmetros, os animais contaminados com OTA e tratados com L-triptofano tiveram níveis de IgA/IgY do conteúdo cecal, células IgA⁺ do duodeno e leucócitos totais circulantes similares aos animais do grupo controle, assim como o hematócrito e a altura das vilosidades do duodeno ($p > 0,05$). Conclui-se que a exposição à uma dose alta de OTA no início da vida dos pintainhos induz a alterações na mucosa local e a utilização do tratamento com L-triptofano é válido para diminuir os efeitos prejudiciais da OTA, ao estimular a produção de imunoglobulinas locais e manter a integridade da mucosa.

Palavras-chave: IgY; IgA; vilosidades; criptas; micotoxinas.

RICCI, Fernando Galdino. **Evaluation of effects of acute intoxication by Ochratoxin A in chickens and analysis of treatment with L-tryptophan.** 63 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. that can contaminate products of plant origin, widely used in animal feed. Through oral exposure, through the consumption of contaminated food, OTA affect various systems of animals, such as the immune and gastrointestinal systems. The objectives of the present study were to assess the impact of OTA poisoning on chicks, and to verify whether treatment with L-tryptophan can inhibit its toxic effects. After inoculation of a single dose of OTA (1.4 mg/kg body weight) on one-day-old broiler chicks (Cobb 500), on the first day of the experiment, four daily doses of L-tryptophan (100 mg/kg body weight) were administered. On the 14th day, systemic and local immune system responses were assessed by quantifying plasma and cecal content levels of immunoglobulins A and Y (IgA/IgY), total circulating leukocytes levels, titration of vaccine maternal antibodies against Newcastle Disease Virus (NDV) and counting the number of positive immunoglobulin A cells (IgA⁺) in the duodenum mucosa, in addition to the impact on the local mucosa with the assessment of the duodenum morphometry. Additionally, some hematological and biochemical parameters were evaluated. To quantify IgA/IgY, the immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed, the IgA⁺ cells were revealed by immunohistochemistry, the titration of vaccine antibodies by direct ELISA, the total circulating leukocytes levels by count (Neubauer chamber) and the duodenum morphometry by measuring tissues stained with hematoxylin/eosin. The levels of IgA/IgY in the cecal content, the number of IgA⁺ cells and the height of the villi and crypts depth of the duodenum of animals contaminated only with OTA decreased significantly, as did the levels of total circulating leukocytes and hematocrit of animals contaminated only with OTA ($p < 0.05$) which demonstrated their toxic effects on local mucosa and hematopoiesis. The treatment with L-tryptophan was beneficial for the animals in several parameters, the animals contaminated with OTA and treated with L-tryptophan had levels of IgA/IgY of the cecal content, IgA⁺ cells of the duodenum and total circulating leukocytes similar to the animals of the control group, as well as hematocrit and villus height of the duodenum ($p > 0.05$). It is concluded that exposure to a high dose of OTA early in the life of chicks induces changes in the local mucosa and the use of treatment with L-tryptophan is valid to reduce the harmful effects of OTA, by stimulating the production of local immunoglobulins and maintain mucosal integrity.

Keywords: IgA; IgY; villus; crypt; mycotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da OTA.....	14
Figura 2 – Via hipotética de biossíntese da OTA	16
Figura 3 – Esquema simplificado de metabolismo do L-triptofano	24
Figura 4 – a) criptas e b) vilosidades do duodeno de frangos de quatorze dias de idade, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	46
Figura 5 – Criptas e vilosidades do duodeno de frangos de quatorze dias de idade, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição alimentar da ração disponibilizada aos animais durante todo o período do experimento	27
Tabela 2 – Atendimento das exigências nutricionais calculada da ração disponibilizada aos animais durante todo o período do experimento.....	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Leucócitos totais circulantes em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	34
Gráfico 2 – Hematócrito em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	35
Gráfico 3 – Hemoglobina em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	36
Gráfico 4 – Proteínas totais plasmáticas em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	37
Gráfico 5 – Ácido úrico em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	38
Gráfico 6 – Ureia em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	39
Gráfico 7 – ALT em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	40
Gráfico 8 – Cortisol plasmático e cerebral em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	41
Gráfico 9 – IgA/IgY plasmática em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	42
Gráfico 10 – Títulos vacinais anti-NDV maternos em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.....	43
Gráfico 11 – IgA/IgY cecal em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	45
Gráfico 12 – Células IgA ⁺ do duodeno em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofan	46
Gráfico 13 – Altura das vilosidades do duodeno em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano	47
Gráfico 14 – Profundidade das criptas do duodeno em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
5-HT	5-hidroxitriptamina
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (albumina bovina sérica)
Ca ²⁺	Cálcio
Cl	Cloro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DL ₅₀	Dose letal 50%
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
Fe ³⁺	Ferro
g	Gramma
GGT	Gamaglutamil transpeptidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (óxido nítrico sintase induzível)
kg	<i>Kilogram</i> (quilograma)
km	<i>Kilometer</i> (quilômetro)

KMnO ₄	Permanganato de potássio
M	Massa molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
N	Normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
NAT	N-Acetil-L-Triptofano
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i> (Vírus da Doença de Newcastle)
NMDA	N-metil-D-aspartato
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Óxido nitroso
O ₂	Oxigênio
OH	Hidroxila
OT α	Ocratoxina α
OT β	Ocratoxina β
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
P	Fósforo
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina fosfatada tamponada)
pH	Potencial hidrogeniônico
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> (espécies reativas de nitrogênio)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
Se	Selênio
SIgA	<i>Secretory IgA</i> (IgA secretora)
SOD	Superóxido desmutase
TDO	Triptofano 2,3-dioxigenase
TJP1	<i>Tight junction protein 1</i> (proteína de junção apertada 1)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> (fator de necrose tumoral- α)
xg	<i>Relative centrifugal force</i> (força centrífuga relativa)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	OCRATOXINA A	12
2.1.1	Espécies produtoras.....	12
2.1.2	Propriedades físico-químicas e biossíntese	14
2.1.3	Mecanismos de ação.....	17
2.1.4	Intoxicação em frangos.....	18
2.1.5	Uso de agentes protetores contra OTA em aves.....	20
2.2	L-TRIPTOFANO.....	22
2.2.1	Metabolismo	22
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVOS GERAIS	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ANIMAIS E ALOJAMENTO	26
4.2	PREPARO DA OTA E DO L-TRIPTOFANO	26
4.3	COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA RAÇÃO	27
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL	28
4.5	ELISA DE IMUNOCAPTURE PARA IGA/IGY	28
4.6	ELISA DIRETO PARA IGY ANTI-NDV	29
4.7	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO DUODENO	30
4.7.1	Imunohistoquímica para células IgA ⁺	30
4.7.2	Morfometria do duodeno.....	31
4.8	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	31
4.9	ELISA DE IMUNOCAPTURE PARA CORTISOL.....	32
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXO – CEUA.....	61
	APÊNDICE – ARTIGO 1	62
	APÊNDICE – ARTIGO 2	63

1 INTRODUÇÃO

A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. É um contaminante natural de diversos produtos de origem vegetal, utilizados como ingredientes ou componentes na alimentação dos frangos, expostos através do consumo dos alimentos contaminados. Causa perdas no setor produtivo, pois leva à diminuição de ganho de peso, diminuição da ingestão de alimentos, aumento da conversão alimentar e aumento de mortalidade das aves, que resulta em prejuízos econômicos, e induz nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunotoxicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e possivelmente é carcinogênica (BATTACONE; NUDDA; PULINA, 2010, MALIR et al., 2016, KHATOON; ABIDIN, 2018).

A exposição crônica e subcrônica em doses menores é capaz de causar mais prejuízos de que a intoxicação aguda em dose elevada (O'BRIEN; DIETRICH, 2005). Porém, atualmente pouco se conhece sobre a intoxicação aguda pela OTA, e quais os efeitos da OTA na mucosa intestinal e no sistema imune associado à essa mucosa. O trato gastrointestinal é importante para os frangos devido sua função de absorção dos nutrientes essenciais para o crescimento, e se constitui de uma extensa barreira para a entrada de patógenos, portanto, a integridade da mucosa resulta em melhores ganhos produtivos (LILLEHOJ; TROUT, 1996), além de ser o local onde ocorre a maior absorção de OTA (DEVREESE et al., 2018), e potencialmente onde ela pode causar maior impacto.

O L-triptofano é um aminoácido essencial para os animais monogástricos, pois não possuem a maquinaria enzimática necessária para produzi-lo (YAO et al., 2011). A sua principal função no organismo dos animais é a síntese proteica, mas também é o precursor de importantes substâncias, como a 5-hidroxitriptamina, ou serotonina (5-HT), melatonina, niacina, ácido nicotínico, ácido quinurênico, ácido quinolínico, entre outros (YAO et al. 2011, HOGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a intoxicação aguda pela OTA em pintainhos de um dia de idade, com utilização de uma dose única (1,4 mg/kg de peso vivo), administrada por via oral. Além disso, de verificar se uma nova metodologia para inibir os efeitos tóxicos da OTA pudesse ser válida para o uso na avicultura comercial, com uso de tratamento com quatro doses diárias de L-triptofano (100 mg/kg de peso vivo), administrada por via oral, subsequentes a intoxicação pela OTA.

Alguns parâmetros foram analisados nos animais, principalmente relacionados ao sistema imunológico e gastrointestinal, como a quantificação de imunoglobulina A e Y (IgA/IgY) plasmáticas e cecais, detecção de células imunoglobulina A positivas (IgA⁺) e mensuração da morfometria do duodeno, determinação dos títulos vacinais maternos contra o Vírus da Doença de Newcastle (NDV) plasmáticos, contagem de leucócitos totais circulantes, quantificação de cortisol plasmático e cerebral, além da determinação de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OCRATOXINA A

2.1.1 Espécies produtoras

A OTA é uma micotoxina, foi descoberta e caracterizada em 1965, na África do Sul, extraída de um meio de cultura contaminado com o fungo *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE et al., 1965). Posteriormente, foi identificada em uma amostra de presunto caseiro contaminado pela espécie *Penicillium viridicatum* (WALBEEK et al., 1969), sendo essa espécie depois reclassificada como *P. verrucosum* (PITT, 1987). Outras espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* produzem a OTA através de seu metabolismo, as espécies de *Penicillium* possuem temperatura ótima de crescimento em regiões de climas temperado, onde as temperaturas são mais baixas (15-22°C), e as espécies de *Aspergillus* possuem temperatura ótima de crescimento em regiões de clima tropical, onde as temperaturas são mais altas (25-30°C) (ABARCA et al., 1994, TÉREN et al., 1996, LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001, O'BRIEN; DIETRICH, 2005, MALIR et al., 2016, WANG et al., 2016).

No gênero *Penicillium*, ocorrem divergências em relação à classificação das espécies, sendo que os estudos consideram *P. verrucosum* e *P. nordicum* como as únicas produtoras de OTA do gênero (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001, CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2010). *P. verrucosum* pode contaminar cereais como trigo, cevada, aveia e centeio e também outros produtos vegetais, é considerado o principal produtor de OTA presente em regiões de clima temperado, sua temperatura de crescimento varia de 10-21°C e produz quantidade moderada de OTA. *P. nordicum* pode contaminar alimentos com alta concentração de cloreto de sódio (NaCl), como carnes secas e curadas e queijos, sua temperatura de crescimento é em torno de 15°C e produz grande quantidade de OTA (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001, CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2010, DUARTE; PENA; LINO, 2010, KHATOON; ABIDIN, 2018).

No gênero *Aspergillus*, uma grande quantidade de espécies são produtoras de OTA: *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sclerotium*, *A. steynii*, *A. albertensis*, *A. wentii* e *A. sulphurous*, pertencentes a seção *Circumdati*

(VARGA et al., 1996, FRISVAD et al., 2004, KHOURI; ATOUI, 2010), e *A. niger* var. *niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. awamori*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*, pertencentes a seção *Niger*. (ABARCA et al., 1994, VARGA et al., 1996, KHOURI; ATOUI, 2010). As espécies mais importantes do gênero são *A. niger* e *A. carbonarius*. *A. niger* var. *niger* é um dos principais e mais comuns contaminante de alimentos, é utilizado em processos industriais e na biotecnologia, pode contaminar frutas, uvas, vinhos e grãos de café, sua temperatura de crescimento é acima de 30°C, cresce com alta incidência de luminosidade e produz quantidade moderada de OTA. *A. carbonarius* é um contaminante menos comum, também pode contaminar uvas, vinhos e grãos de café, sua temperatura de crescimento é em torno de 30°C, cresce com alta incidência de luminosidade e produz grande quantidade de OTA (PALACIOS-CABRERA et al., 2005; KHOURI; ATOUI, 2010, MALIR et al., 2016, GEISEN et al. 2018).

A OTA pode estar presente em uma variedade de produtos de origem animal e vegetal, como: arroz, cevada, milho, painço, trigo, feijão, sorgo, soja, aveia, azeitonas, frutas secas, nozes, amendoim, grãos de café, uvas e seus produtos (suco e vinho), carne, leite e queijo (DUARTE; LINO; PENA, 2010, KHOURY, ATOUI, 2010, MALIR et al., 2016). Esses produtos estão presentes nos componentes ou são ingredientes importantes na dieta dos frangos e quando a contaminação desses alimentos ocorre, não é possível sua remoção (KHOURY, ATOUI, 2010). Portanto, os frangos podem ingerir a micotoxina, e isso causa a contaminação de seus produtos, como músculos e órgãos (IQBAL et al., 2014).

Os principais fatores que determinam a contaminação dos produtos vegetais pelas espécies produtoras são as más condições de colheita, secagem, manuseio transporte e armazenamento dos produtos vegetais (KHANEGHAH et al., 2018). As condições climáticas no momento da colheita, tipo de grão colhido (perfil nutricional), composição da população fúngica, interação e competição entre os fungos, qualidade de colheita e de transporte, temperatura e umidade de armazenamento, pH e temperatura de processamento, uso de enzimas e leveduras, adição de ingredientes contaminados (frutas secas, por exemplo), limpeza e cozimento e extrusão dos alimentos são importantes condições para se evitar a contaminação dos alimentos pela OTA (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

Dentre as mais principais micotoxinas identificadas e descritas, a OTA é uma das mais importantes devido à sua elevada toxicidade (DUARTE; LINO; PENA, 2010)

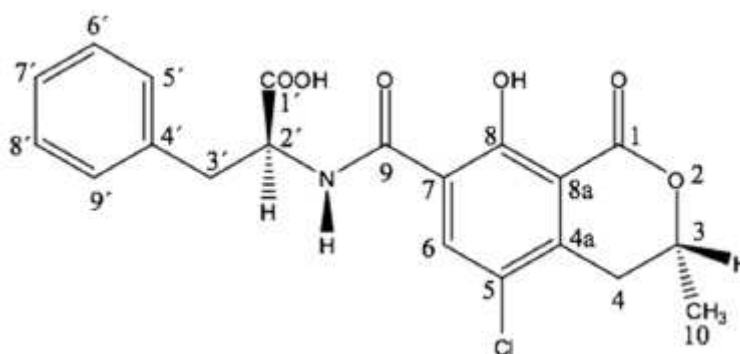
e importância na saúde pública, pois há risco de contaminação em seres humanos. Khaneghah et al. (2018) realizaram uma meta-análise para verificar a prevalência da OTA em alimentos produzidos com cereais destinados ao consumo humano, onde a OTA estava presente em 51% desses alimentos, sendo 60% em massas, 60% em pães, 54% em flocos de milho, 51% em biscoitos e 54% em cereais matinais.

Por isso, algumas legislações buscam recomendar os níveis máximos de OTA presentes em alimentos destinados ao consumo por animais e seres humanos. Na União Europeia, os níveis máximos recomendados em cereais não processados e processados para consumo humano são de 5 µg/kg e 3 µg/kg, respectivamente (EC, 2002). Nos produtos destinados à alimentação animal os níveis máximos permitidos são de 0,25 mg/kg para cereais e produtos de cereais e 0,1 mg/kg para ingredientes complementares de alimentação de aves domésticas (KYPRIANOU, 2006).

2.1.2 Propriedades físico-químicas e biossíntese

A estrutura química da OTA (C₂₀H₁₈ClNO₆, Figura 1) é formada por um grupo dihidro-isocumarina ligado a um grupo L-β-fenilalanina por uma ligação do tipo amida, com massa molecular de 403,81 g/mol (MALIR et al., 2016; TAO et al., 2018). É considerada um ácido orgânico fraco, de estrutura cristalina e sólida, coloração branca a transparente e inodora, solúvel em solventes polares orgânicos em pH ácido ou neutro e solúvel em soluções alcalinas, mas pouco solúvel em água.

Figura 1 – Estrutura química da OTA.



Fonte: Malir et al. (2016).

A OTA possui termo resistência, ponto de fusão de 168-173°C e resistência ao vapor sob pressão a 121°C por três horas (KHOURY, ATOUI, 2010; KÓSZEGI; POÓR,

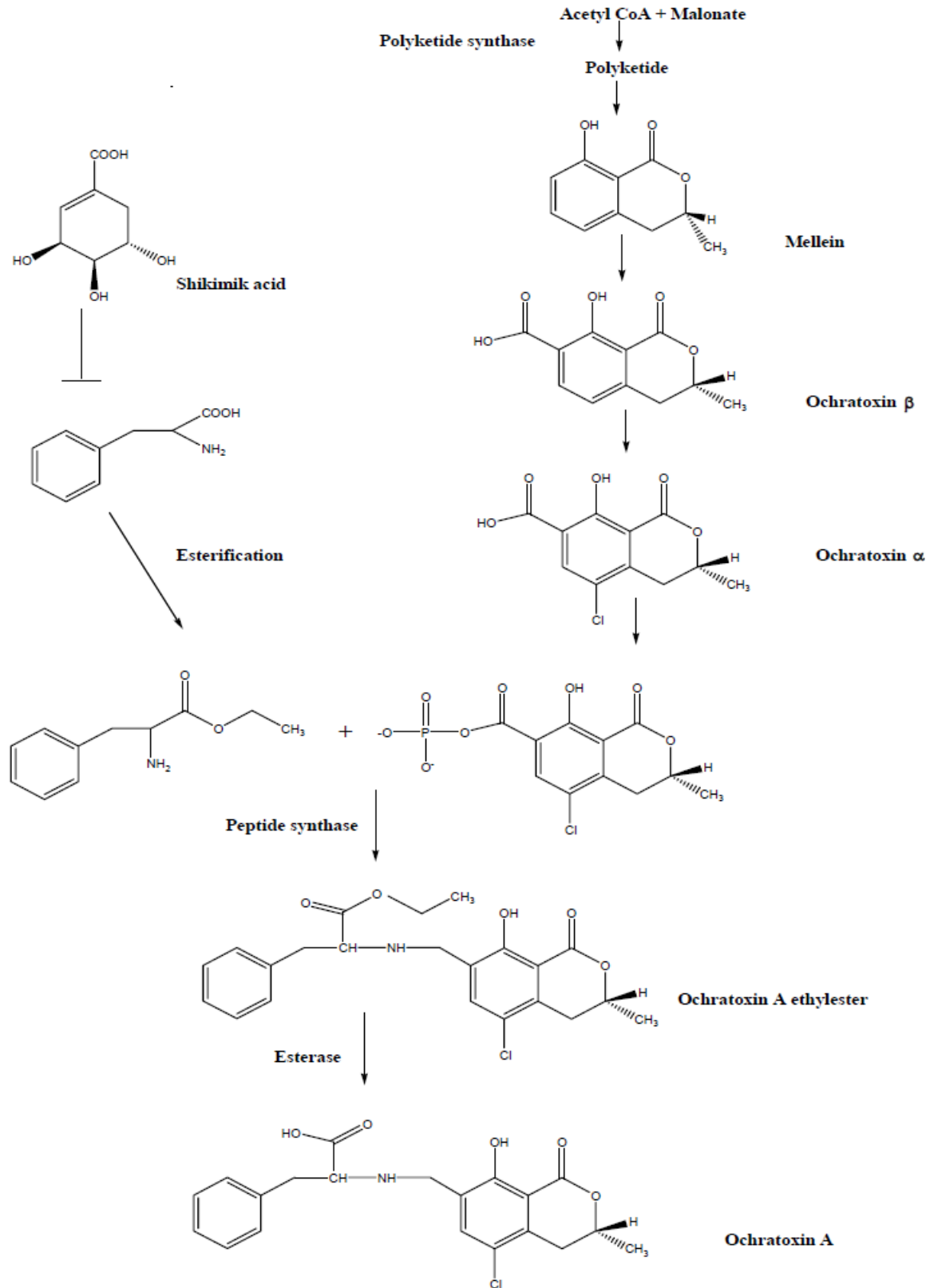
2016). É completamente degradada quando tratada com solução concentrada com excesso de hipoclorito de sódio (NaOCl) (CASTEGNARO et al., 1991). Pode ser armazenada a -20°C durante vários anos quando dissolvida em etanol ou metanol, também pode ser preservada com a evaporação do solvente e seu armazenamento como um filme (VALENTA, 1998).

Ao menos 20 análogos de Ocratoxinas foram identificados, entre eles a OTA é produzida em maior quantidade (HUFFMAN; GERBER; DU, 2010). Na família das Ocratoxinas, os principais representantes são OTA, Ocratoxina B (OTB) e Ocratoxina C (OTC), mas a OTA possui a maior toxicidade devido ao seu átomo de cloro (Cl) presente no anel do grupo dihidro-isocumarina. A OTB é 10-20 vezes menos tóxica que a OTA, isso ocorre pela substituição do átomo de Cl por um átomo de hidrogênio (H). Uma alteração no grupo L-β-fenilalanina em L-β-fenilalanina etil éster forma a OTC, com pouca ou nenhuma toxicidade conhecida (O'BRIEN; DIETRICH, 2005; KHATOON; ABIDIN, 2018).

A biossíntese da OTA ainda não está totalmente elucidada, a principal hipótese é de que ocorre por meio de duas vias. Na primeira via, o grupo dihidro-isocumarina é originado pela síntese de policetídeos, ao utilizar como precursores moléculas de malonato e acetato, dando origem à molécula chamada *mellein*, que sofre metilação e oxidação dando origem à Ocratoxina-β (OTβ). A OTβ recebe uma molécula de Cl através de uma cloroperoxidase, formando a Ocratoxina-α (OTα). Na segunda via, o grupo L-β-fenilalanina é originado a partir de ácido chiquímico, que é ativado pelo éster etílico, e tem sua porção acila deslocada. Posteriormente, esses dois grupos se ligam através de um peptídeo sintase para formar uma ligação amida, dando origem à OTC. Na última etapa, ocorre a formação da OTA pela transesterificação e desesterificação da OTC por uma esterase (Figura 2) (KHOURY; ATOUI, 2010; WANG et al., 2016).

Outros estudos utilizaram marcação de carbono nos intermediários da OTA e sugerem que o *mellein* e a OTC não tem envolvimento com a biossíntese da OTA, sendo a OTβ transformada em OTB por um grupo amida para depois receber a molécula de Cl dando origem à OTA, portanto a OTB não seria um subproduto da OTA, mas faz parte da sua biossíntese como um intermediário (WANG et al., 2016).

Figura 2 – Via hipotética de biossíntese da OTA.



Fonte: Khoury; Atoui (2010).

2.1.3 Mecanismos de ação

Devido à presença do grupo L- β -fenilalanina na sua estrutura química, Creppy, Röschenthaler e Dirheimer (1985) demonstraram que a OTA podia competir com o aminoácido fenilalanina presente nas células dos organismos, inibindo a utilização de fenilalanina em seus processos e na síntese de proteínas, e esse efeito poderia ser revertido com o fornecimento de um excesso do aminoácido fenilalanina. Porém, outro estudo realizado *in vitro* demonstrou que a presença do aminoácido fenilalanina não diminuiu a toxicidade da OTA, e a OTA não teve capacidade de afetar os processos dependentes da fenilalanina (BRUININK; SIDLER, 1997).

A OTA é uma inibidora de síntese de proteínas, isso já foi demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* (KÓSZEGI; POÓR, 2016), porém os mecanismos pelos quais isso ocorre não estão totalmente claros, alguns autores afirmam que a OTA pode inibir a atividade da enzima fenilalanina ácido ribonucleico transportador (t-RNA) sintase (DIRHEIMER, 1996), e outros afirmam que ela pode inibir a formação de aminoacil-tRNA sintase pela inibição da produção de adenosina trifosfato (ATP) mitocondriais e impede a ligação do aminoácido ao tRNA (KHATOON; ABIDIN, 2018).

Nas mitocôndrias a OTA diminui a respiração celular, pois atua como inibidora competitiva das proteínas transportadoras da membrana interna, inibe o transporte de elétrons e a fosforilação intramitocondrial de adenosina difosfato (ADP), levando à inibição da produção de ATP e de energia pelas células (MEISNER; CHAN, 1974).

Pode causar genotoxicidade, pois acredita-se que após sua biotransformação, a OTA produz espécies eletrofílicas, que se ligam e formam ductos de forma covalente com o ácido desoxirribonucleico (DNA), o que estimula a mutagenicidade. Acredita-se também que as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela OTA lesionam diretamente o DNA (PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2012, LAN et al., 2020).

A OTA induz à formação acentuada de ROS, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, essas ROS causam lesões oxidativas em lipídeos, DNA e proteínas. Na intoxicação pela OTA o excesso de ROS supera a capacidade antioxidante das células do organismo, o que induz às lesões (KÓSZEGI; POÓR, 2016, KHATOON; ABIDIN, 2018, LAN et al., 2020). A OTA também induz a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), ao aumentar a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que causa a elevação de óxido nítrico (NO) e de nitratos e nitritos, e os altos níveis de NO podem

causar estresse nitrosativo pois reagem com oxigênio (O_2) e formam óxido nitroso (NO_2) e hidroxila (OH). (KÓSZEGI; POÓR, 2016, TAO et al., 2018).

Outro importante mecanismo da OTA é a indução de peroxidação lipídica, isso ocorre em microsomas dependentes de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), pois ela utiliza o ferro (Fe^{3+}) como cofator, com a formação de um complexo $OTA-Fe^{3+}$, depois reduzido em $OTA-Fe^{2+}$, levando a formação de hidroxilas (OH) (RAHIMTULA; BUSSACCHINI-GRIOT; BARTSCH, 1988, TAO et al., 2018). A peroxidação lipídica também induz o aumento da permeabilidade da membrana celular ao cálcio (Ca^{2+}), que leva à diminuição de seu armazenamento intracelular. (KÓSZEGI; POÓR, 2016).

A OTA também induz a apoptose celular, embora os mecanismos ainda não estejam totalmente claros, isso possivelmente ocorre devido à desregulação de vias de transdução de sinais celulares, estresse oxidativo, aumento de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) e lesões no DNA. (O'BRIEN; DIETRICH, 2005, KÓSZEGI; POÓR, 2016, TAO et al., 2018).

2.1.4 Intoxicação em frangos

A intoxicação pela OTA em frangos está relacionada à contaminação de seus alimentos e rações, não sendo contagiosa ou infecciosa entre os animais (DUARTE; LINO; PENA, 2011). A exposição dos frangos à OTA causa prejuízos nos índices de produção ao induzir a diminuição do ganho de peso e consumo diário de ração e aumento da conversão alimentar e níveis de mortalidade (ELAROUSSI et al. 2006, POZZO, et al, 2013, SHARMA; MANDAL; SINGH, 2016, SOLCAN et al., 2015, KHAN et al., 2018, RAO; VARRA; KUMAR, 2018).

Nos parâmetros hematológicos, a OTA induz nos animais a diminuição do número de hemácias e hemoglobina, diminuição do número de leucócitos totais e linfócitos e aumento de heterófilos e monócitos, indicativo de processo inflamatório, diminuição dos níveis de proteínas totais e albumina, e imunossupressão ao diminuir os níveis de IgY e IgA plasmáticas (DWIVEDI; BURNS, 1984, ELAROUSSI et al. 2006, POZZO, et al, 2013, SOLCAN et al., 2015, KHAN et al., 2018, KHAN et al., 2019).

Nos parâmetros bioquímicos, induz a diminuição de colesterol e triglicerídeos, aumento das enzimas marcadoras de lesões hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamil transferase (GGT), aumento

das enzimas marcadoras de lesões renais creatinina, ácido úrico e ureia, e diminuição de Ca^{2+} e fósforo (P) circulantes (JEEVANA, et al., 2017, POZZO, et al., 2013, RAO; VARRA; KUMAR, 2018, KHAN et al., 2018).

Devido aos seus mecanismos de ação, ocorre a indução de estresse oxidativo nas aves. Hameed et al. (2017) verificaram a diminuição dos níveis de enzimas de função antioxidante, como glutathiona peroxidase e superóxido dismutase (SOD), além do status antioxidante total no plasma, hemácias, fígado, rins e músculos de frangos contaminados com 1,6 a 6,4 mg/kg de OTA na dieta.

Nos tecidos a OTA induz lesões, nos rins causa degeneração, alargamento e distensão dos túbulos contorcidos proximais (tubulonefrose), infiltração de células mononucleares no tecido intersticial, proliferação celular focal nos túbulos, infiltração focal intertubular, hiper celularidade dos glomérulos e glomerulonefrose. No fígado causa fibrose local no parênquima ao redor dos ductos biliares, infiltração de células mononucleares nas áreas portais, aumento de tamanho, alterações degenerativas e vacuolizações dos hepatócitos e presença de áreas necróticas no tecido hepático. Esses dois órgãos são alvos da OTA, devido ao esforço para excretá-la e a exposição durante a recirculação entero-hepática, metabolização e eliminação, o que causa seu aumento de peso relativo devido aos processos inflamatórios e de hiperemia (BIRÓ et al., 2002, MILIĆEVIĆ et al., 2014, KHATOON; ABIDIN, 2018).

A OTA também é prejudicial aos órgãos linfoides, na bursa de Fabricius causa depleção linfoide, linfolise, acúmulo de secreções e vacuolização do citoplasma das células, no baço causa depleção linfoide e aumento de número de reticulócitos da polpa vermelha, que levam à diminuição do peso relativo desses órgãos (BIRÓ et al., 2002, ELAROUSSI et al., 2008, KHAN et al., 2018, KHAN et al., 2019).

No intestino, por toda sua extensão a OTA causa alterações na morfologia e lesões celulares, leva à diminuição da altura e alargamento das bases das vilosidades e criptas podem ficar com formato irregular, com diminuição da superfície de absorção dos nutrientes (SHARMA; MANDAL; SINGH, 2016). As lesões causadas pela OTA são o desnudamento de epitélio e hiperplasia nas criptas, alteração de composição de lipídeos e fosfolipídios dos segmentos intestinais e inibição do crescimento de células epiteliais e alteração das funções de transporte. As alterações na barreira intestinal são presentes devido à infiltração e inflamação da barreira e aumento de permeabilidade, com o aumento de susceptibilidade à agentes infecciosos e também aumento da própria absorção da OTA pela mucosa (MARESCA et al., 2001, EL

CAFSI, et al. 2019). Outro efeito importante é a alteração da imunidade local, Solcan et al. (2015) verificaram que houve diminuição das contagens de leucócitos e linfócitos intraepiteliais na mucosa intestinal de frangos contaminados com 0,001 a 0,05 mg/kg de peso vivo por dia.

Em relação à toxicocinética, a OTA é absorvida rapidamente no estômago e intestino delgado dos frangos e sofre pouca ou nenhuma degradação (BATTACONE; NUDDA; PULINA, 2010). Quinze minutos após a ingestão atinge sua concentração plasmática máxima no organismo, com um segundo pico de concentração ocorrendo após quatro a seis horas, isso pode ser explicado devido recirculação entero-hepática, e mesmo após trinta e seis horas a OTA continua presente no plasma, mas em níveis menores. A DL_{50} da OTA em frangos é 3,3 mg/kg de peso vivo (O'BRIEN; DIETRICH, 2005, DEVREESE et al., 2018).

Em relação à sua distribuição, possui alta afinidade pelas proteínas e outras macromoléculas do sangue, principalmente para a albumina sérica, essa ligação entre OTA e albumina diminui a sua eliminação pelo organismo e cria um reservatório de OTA, com aumento de sua biodisponibilidade (O'BRIEN; DIETRICH, 2005). A ligação da OTA nas proteínas plasmáticas é 90 a 97% e a meia-vida de eliminação é de oito a quatorze horas em frangos de corte. (DEVREESE et al., 2018).

Após sua absorção, a biodisponibilidade é de aproximadamente 40% nos frangos, onde é eliminada rapidamente do compartimento central (plasma e tecidos com alta perfusão), e se distribui mais no compartimento periférico (músculos, pele e tecido adiposo) (GALTIER; ALVINERIE; CHARPENTEAU, 1981). Nas aves, a sua excreção é mais rápida que nos mamíferos, isso diminui a bioacumulação e reduz a exposição do organismo à OTA (DUARTE; LINO; PENA, 2011).

2.1.5 Uso de agentes protetores contra OTA em aves

Atualmente, muitas pesquisas com OTA buscam componentes com diferentes mecanismos de ação para inibir seus efeitos tóxicos no organismo dos animais e seres humanos. A utilização de antioxidantes tem sido muito importante, Yu et al. (2018) avaliaram a administração de glicirrizina, L-arginina, silibinina e glucoronolactona antes da intoxicação pela OTA, e verificaram efeito protetor em hepatócitos de frangos cultivados *in vitro*, aumentando os níveis de SOD e glutathione e diminuindo os níveis de ALT e AST e as taxas de apoptose das células.

Ruan et al. (2018) verificaram que a curcumina, substância com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana preveniu os efeitos oxidantes causados pela OTA em patos: diminuição de enzimas antioxidantes, como SOD, glutathione peroxidase e capacidade antioxidante total no plasma e de SOD e glutathione peroxidase no jejuno e aumento das citocinas TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β) no jejuno, e esse tratamento levou ao aumento de expressão de proteínas de junção das células da mucosa intestinal ocludina e proteína de junção apertada 1 (TJP1), diminuição de expressão de genes relacionados à apoptose e prevenção de alterações histopatológicas.

Sorrenti et al. (2013) descreveram a ação moduladora de vários antioxidantes em relação à OTA, como as vitaminas E (α -tocoferol), A (retinol) e C (ácido ascórbico), compostos fenólicos, licopeno e zinco (Zn), ao promover a diminuição da produção de ROS e o dano ao DNA e aumentam os níveis de glutathione peroxidase, diminuindo as taxas de apoptose celular e prevenindo a produção de metabólitos eletrofílicos, tanto em testes com células *in vivo* quanto *in vitro*.

Compostos biológicos como as leveduras, também foram testados. Yang et al. (2020) analisaram o tratamento com leveduras enriquecidas com selênio (Se) com redução de efeitos tóxicos em frangos, com diminuição de alterações histopatológicas no ceco, de citocinas IL-1 β , IL-6 e interferon- γ (IFN- γ), aumento de glutathione e SOD, aumento da expressão de genes de junção ocludina e claudina-1 e inibição do desequilíbrio da microbiota, aumentando a diversidade microbiana.

Tong et al. (2020) também utilizaram leveduras enriquecidas com selênio (Se), e verificaram redução dos efeitos tóxicos da OTA em frangos na morfometria (altura das vilosidades e profundidade das criptas), aumento do número de células globosas no duodeno, jejuno e íleo, SOD e glutathione no duodeno e jejuno e diminuição de expressão de IL-1 β e TNF- α no duodeno, jejuno e íleo. Khan et al. (2017) verificaram que lodo de leveduras de uma destilaria preveniu os efeitos da OTA em galinhas ao diminuir os níveis plasmáticos de ALT, creatinina e ureia e ao aumentar os níveis plasmáticos de anticorpos totais, IgY e IgM.

Ślizewska, Nowak e Smulikowska (2016) utilizaram uma mistura de probióticos e verificaram a diminuição de genotoxicidade e citotoxicidade causados pela OTA no conteúdo fecal de frangos.

Outros componentes utilizados são os adsorventes de OTA. Qu et al. (2017) utilizaram uma mistura de componentes adsorventes (montmorillonita e parede celular

de leveduras) para verificar a redução dos efeitos de contaminação pela OTA em frangos, esses compostos promoveram o aumento da altura das vilosidades e profundidade das criptas do intestino, redução da OTA residual nos rins e no fígado, diminuição dos níveis de AST, GGT, diminuição de peso relativo dos rins e do fígado e aumento de peso relativo do timo dos animais.

2.2 L-TRIPTOFANO

2.1.1 Metabolismo

O L-triptofano é um aminoácido essencial para os animais monogástricos, pois não pode ser sintetizado no organismo devido à ausência de maquinaria enzimática necessária. Essa maquinaria está presente em bactérias, fungos e plantas, mas para os animais se torna necessário a ingestão de L-triptofano na forma de proteínas (MOFFETTI; NAMBOODIRI, 2003, YAO et al., 2011).

A principal função do L-triptofano é auxiliar na síntese proteica (YAO et al., 2011), é o aminoácido essencial menos abundante do organismo, por isso pode ser limitante para a síntese proteica (WANG et al., 2016). É importante pois também é precursor de substâncias essenciais produzidas, como a 5-hidroxitriptamina, ou serotonina, um neurotransmissor essencial pois regula a motilidade e secreção gastrointestinal, atua no sistema neurológico modulando a cognição, sono, humo e apetite, também é precursor de melatonina, que estimula a proteção da mucosa gástrica, função exócrina do pâncreas e regula os ritmos de sono e vigília associados à idade e temperatura corporal, além de outras substâncias como ácido nicotínico, niacina, ácido quinurênico e ácido quinolínico, entre outros (YAO et al. 2011, HOGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019).

Um tipo de triptofano já foi utilizado como componente para inibição da OTA, o N-Acetil-L-Triptofano (NAT) demonstrou atividade protetora contra a toxicidade *in vitro* ao reverter a inibição de proliferação celular e proteger contra indução apoptose, além combater o estresse oxidativo causado pela OTA e restaurar o potencial da membrana mitocondrial, também foi sugerido que o NAT se liga no sítio de ligação da OTA na fenilalanila-tRNA sintetase e diminui a inibição de síntese proteica (ARGAWAL et al., 2020).

Sabe-se que em aves o fornecimento de L-triptofano na dieta em determinados níveis pode aumentar o consumo alimentar, ganho de peso e os níveis de glicose, albumina, proteínas totais, imunoglobulinas, INF- α , INF- γ e diminuir os níveis de AST, ureia e ácido úrico, corticosterona, triglicerídeos e colesterol plasmáticos (EMADI et al., 2011, WEI et al., 2011; YUE; GUO; YANG, 2017, KHATTAK; HELMBRETCH, 2019, MUND et al., 2019). Possui também atividade antioxidante, pois aumenta os níveis de glutathione peroxidase, catalase, capacidade antioxidante total e diminuição de malondialdeído no plasma e nos tecidos (LIU et al., 2015). No intestino dos frangos, o L-triptofano aumenta os níveis de IgA secretora (SIgA) e das proteínas de junção claudina-1 (YUE; GUO; YANG, 2017). Em suínos, demonstrou-se que o L-triptofano melhora os parâmetros morfométricos, com aumento da altura das vilosidades e profundidade das criptas (TOSSOU et al., 2016).

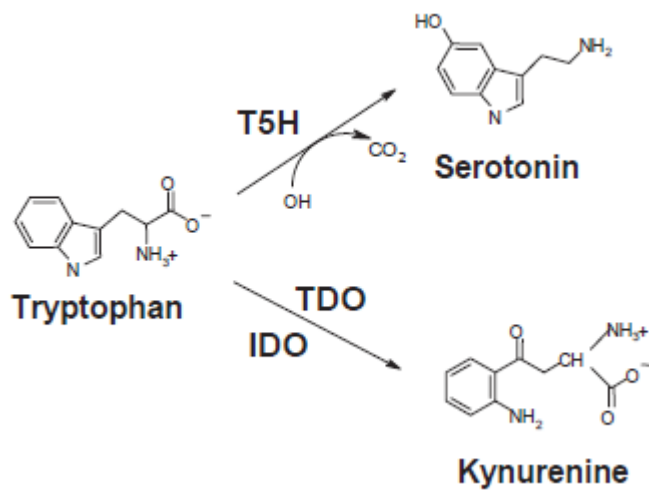
Em relação ao seu metabolismo, o L-triptofano possui três vias diferentes: a) hidroxilação e descarboxilação para produção de 5-HT (1-2%), b) desaminação e descarboxilação para produção de ácido indolacético (2-3%) e c) degradação em niacina, piruvato e acetil-CoA, através da via da quinurenina (>95%) (YAO et al., 2011).

Na via de produção de 5-HT, o L-triptofano sofre hidroxilação pela triptofano hidroxilase e forma 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase e dá origem à 5-hidroxitriptamina (5-HT) (SCHÖCKSNADEL et al. 2006, YAO et al., 2011). No cérebro, na glândula pineal e nas retinas a 5-HT sofre acetilação pela arilalquilamina N-acetiltransferase e forma N-acetilserotonina que é metilado pela N-acetilserotonina O-metiltransferase e dá origem à melatonina (SLOMINSKI et al., 2002).

Outra via importante é da quinurenina, nessa via a enzima hepática triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e a enzima extra hepática indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) catalisam a reação para formar a quinurenina, essas duas enzimas são induzidas por glicocorticoides e por citocinas pró-inflamatórias, respectivamente (Figura 2). A quinurenina é transformada no cérebro em ácido quinurênico, que é um neuroprotetor antagonista de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), ou ácido quinolínico que produz compostos neurotóxicos, como agonistas de receptores NMDA e ROS. O ácido quinolínico também produz nicotina e ácido nicotínico (HOGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019). A presença de estresse crônico ou infecções no organismo, levam

o L-triptofano a ser utilizado em maior quantidade pela via da quinurenina e diminui a produção de 5-HT (YAO et al., 2011, HOGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019).

Figura 3 – Esquema simplificado de metabolismo do L-triptofano.



Fonte: Schröcksnadel et al. (2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar os efeitos tóxicos da contaminação aguda pela OTA, e se o tratamento com L-triptofano, pode inibir os efeitos tóxicos da OTA em frangos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os parâmetros hematológicos (níveis de hematócrito, leucócitos totais circulantes e hemoglobina)
- Analisar os parâmetros bioquímicos (níveis de ALT, ureia, ácido úrico, cortisol plasmático, cortisol cerebral e proteínas totais plasmáticas).
- Quantificar os níveis de IgA/IgY plasmáticas e do conteúdo cecal.
- Titular os níveis de IgY anti-NDV plasmáticas de origem materna.
- Determinar os números de células IgA⁺ no duodeno.
- Verificar a morfometria do duodeno (altura das vilosidades e profundidade das criptas).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Foram utilizados no experimento 36 pintainhos (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Cobb 500, machos e de um dia de idade. Os animais foram transportados por 100 km, em condições adequadas de temperatura e umidade, no dia de início do experimento. As salas e gaiolas utilizadas foram higienizadas e depois desinfectadas com formalina e permanganato de potássio (KMnO₄), antes do alojamento. Os animais foram alocados em condições ideais de manejo, com fotoperíodo de 12 horas por dia, e temperatura ambiente de 30°C na primeira semana e 28°C na segunda semana do experimento. Todos os animais receberam a mesma dieta, formulada previamente para satisfazer suas exigências nutricionais. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento e foram trocadas diariamente. Gaiolas, comedouros e bebedouros também foram higienizados diariamente. O experimento foi conduzido com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina, protocolo nº 18289.2017.16 (Anexo 1).

4.2 PREPARO DA OTA E DO L-TRIPTOFANO

A OTA (*Cayman Chemical* 111439; *Ann Arbor, MI, US*) foi diluída em etanol absoluto e obteve-se uma concentração de 2 mg/mL, sendo armazenada a 4°C por 24 horas para melhor diluição. Para inoculação nos animais, a OTA foi diluída em solução salina fosfatada tamponada (PBS) 0,01 M, e administrada em volume total de 0,5 mL por animal na concentração de 1,4 mg/kg de peso vivo. O L-triptofano (*Sigma-Aldrich* T0254; *San Louis, MO, US*) foi diluído em PBS 0,01 M, e foi administrado em volume de 0,5 mL por animal na concentração de 100 mg/kg de peso vivo.

4.3 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA RAÇÃO

Tabela 1 – Composição alimentar da ração disponibilizada aos animais durante todo o período do experimento.

Composição alimentar	(%)
Milho grão	47,2234
Soja farelo	44,3657
Óleo de soja	4,1517
Fosfato bicálcico	1,8661
Calcário	1,0327
Sal comum	0,5257
DL-metionina	0,3172
Minerais	0,2000
Vitaminas	0,2000
L-lisina HCl	0,0930
L-treonina	0,0248
Total	100

Fonte: próprio autor (2021).

Tabela 2 – Atendimento das exigências nutricionais calculada da ração disponibilizada aos animais durante todo o período do experimento.

Nutriente	Quantidade	Unidade
Cálcio	1,0110	%
Energia metabolizável	3,0000	Mcal/kg
Fósforo	0,4800	%
Lisina	1,3640	%
Metionina + cisteína	0,9890	%
Metionina	0,6478	%
Proteína bruta	25,3100	%
Sódio	0,2270	%
Treonina	0,8820	%

Fonte: próprio autor (2021).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os 36 pintainhos foram divididos em quatro grupos, com 9 animais em cada:

- Grupo C
- Grupo OTA
- Grupo OTA+T
- Grupo T

No primeiro dia do experimento, os pintainhos dos grupos OTA e OTA+T receberam dose única de OTA (1,4 mg/kg de peso vivo) e os animais dos grupos C e T receberam uma dose de PBS 0,01M. Nos quatro dias posteriores os pintainhos dos grupos C e OTA receberam uma dose diária de PBS 0,01 M estéril e os pintainhos dos grupos OTA+T e T receberam uma dose diária de L-triptofano (100 mg/kg de peso vivo). Todas as administrações foram feitas por via oral, por gavagem. Os animais não foram vacinados durante o experimento.

No dia treze do experimento, o sangue dos animais foi coletado por punção de veia jugular para realização das análises. No dia quatorze, foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi coletado os fragmentos de duodeno e do conteúdo cecal para as análises.

4.5 ELISA DE IMUNOCAPTURA PARA IGA/IGY

O sangue total foi centrifugado a 900 xg por 10 minutos, em seguida o plasma obtido foi coletado e diluído em 1:50 com PBS 0,01M (glicerol 40%), as alíquotas de plasma foram armazenadas em freezer a -20°C até a realização das análises. O conteúdo cecal coletado foi armazenado no freezer a -80 °C até seu processamento, posteriormente coletou-se 0,250 g de conteúdo cecal de cada animal, que foi diluído em 1 mL de PBS 0,01M, em seguida homogeneizado no vórtex e deixado em repouso a 4°C por 10 minutos e centrifugado a 5.590 xg por 5 minutos, foi recolhido o sobrenadante e diluído em 1:2 com PBS 0,01M (glicerol 40%), as alíquotas obtidas foram armazenadas em freezer -20°C até a realização das análises.

Para a quantificação de IgA/IgY no plasma e no conteúdo cecal foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de imunocaptura. As alíquotas foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em 1:5.000 (IgA) e 1:100 (IgY) nas alíquotas provenientes de conteúdo cecal, e 1:20 (IgA) e 1:250.000 (IgY) nas

alíquotas de plasma com PBS 0,01 M (leite desnatado 1%). As placas de ELISA de alta afinidade (*Greiner Bio-One 655061; Frickenhausen, BW, DE*) foram sensibilizadas com volume padronizado de 0,25 µL de anticorpo de captura anti-chicken IgA (*Bethyl Laboratories A30103A; Montgomery, TX, US*) e anti-chicken IgY (*Bethyl Laboratories A30104A; Montgomery, TX, US*) e em seguida foram incubadas a 4°C *overnight*.

Após a sensibilização foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS 0,01M (leite desnatado 5%) por 2 horas a 25°C, seguido de incubação com as amostras diluídas e a curva padrão contendo o soro padrão (*Bethyl Laboratories A30109; Montgomery, TX, US*) em diluições seriadas de 1.000 ng/mL a 15,625 ng/mL (IgA) e 200 ng/mL a 3,125 ng/mL (IgY) com PBS 0,01 M (leite desnatado 1%), por 1 hora a 25°C. Os anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-IgA (*Bethyl Laboratories A30103P; Montgomery, TX, US*) e anti-IgY (*Sigma-Aldrich A9046; San Louis, MO, US*) foram adicionados em diluição de 1:25.000 (IgA/IgY) com PBS 0,01 M (leite desnatado 1%) e incubados por 1 hora a 25°C.

Após a lavagens das placas, foi feita a revelação da reação com o substrato tampão citrato pH 5,0 contendo 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina 0,01% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% por 15 minutos, em seguida foi feita a parada da reação com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. Posteriormente, foi feita a leitura das placas no espectrofotômetro a 450 nm. Para calcular os resultados, as densidades óticas obtidas foram comparadas com as densidades óticas obtidas das curvas padrão de cada placa, as curvas padrão foram construídas com o programa *CurveExpert 1.4 (Hyams Development, 2009, Starkville, MS, US)*.

4.6 ELISA DIRETO PARA IGY ANTI-NDV

Para determinação dos títulos vacinais maternos contra o Vírus da Doença de Newcastle (NDV) foi escolhido o plasma de cinco animais de cada grupo. Foi realizado o ELISA direto com kit comercial para quantificação de anticorpos IgY anti-NDV (*Idexx Laboratories 99-09263; Westbrook, ME, US*), conforme o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO DUODENO

Os fragmentos de duodeno obtidos dos animais foram colocados em frascos contendo formalina 4% para fixação, após 48 horas foram retirados e armazenados em frascos contendo etanol 70%. Para a confecção das lâminas, os fragmentos foram desidratados com concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol absoluto e embebidos em parafina e seccionados em micrótomo, com espessura de 5 μm .

4.7.1 Imunohistoquímica para células IgA⁺

Para quantificação de células IgA⁺ nos fragmentos de duodeno, foi realizada a imunohistoquímica. Os cortes obtidos anteriormente foram desparafinizados com xilol absoluto, hidratados em concentrações decrescentes de etanol e água destilada e lavados com PBS 0,01M (Triton 0,025%) por 10 minutos, sob leve agitação. Em seguida, foram incubados a 70°C para reativação antigênica. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% por 1 hora em temperatura ambiente, seguida de uma nova lavagem.

Em seguida foi feito o bloqueio com contendo albumina bovina sérica (BSA) 1% (PBS 0,01M) por 4 horas em temperatura ambiente, sob leve agitação, seguida de lavagem por 5 minutos. Foi colocado anticorpo conjugado com peroxidase Anti-IgA (ABCAM ab112817; Arlington, VA, US) diluído em 1:100 (PBS 0,01 M) em temperatura ambiente por 1 hora, sob leve agitação, seguida de nova lavagem.

Em seguida foi feita a revelação da reação com o substrato tampão acetato pH 5 contendo 3,3'-Diaminobenzidina 0,1% e H₂O₂ 0,03%. Após rápida passagem em água destilada os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavados rapidamente em água destilada e desidratadas com concentrações crescentes de etanol, seguido da montagem das lâminas.

Os cortes foram observados em microscópio ótico (aumento de 400x) e as imagens foram fotografadas em câmera fotográfica adaptada ao microscópio, com as imagens obtidas foi realizada a contagem de células IgA⁺ em 10 campos por grupo.

4.7.2 Morfometria do duodeno

Para as análises de morfometria foi feita a coloração de hematoxilina/eosina como descrito a seguir: 10 banhos em xilol, 1 minuto em etanol/xilol, 10 banhos em etanol absoluto, 10 banhos em etanol 70%, 10 banhos em etanol 50%, 5 minutos em água corrente, 5 minutos em hematoxilina, lavagem em água corrente por 3 minutos, 10 banhos em etanol 50%, 10 banhos em etanol 70%, 1 banho em solução de ácido clorídrico (HCl), 10 banhos em etanol 70%, 1 minuto e 30 segundos em solução de amoníaco, 10 banhos em água corrente, 10 minutos em solução de carbonato de lítio, 10 banhos em água corrente, lavagem em etanol 70%, 3 minutos em eosina, 10 banhos em álcool 70%, 1 minuto em etanol absoluto, 1 minuto em etanol/xilol, 10 banhos em xilol, 2 minutos em xilol, seguido de montagem das lâminas.

Para avaliação da morfometria foi escolhido o fragmento de cinco animais de cada grupo, foi feita a mensuração da altura de 30 vilosidades e da profundidade de suas criptas adjacentes (aumento de 100x). Foi utilizado o programa *Motic Plus 2.0* (*Motic Group Company, 2007, Hong Kong, CN*) para obtenção das imagens e dos dados.

4.8 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

O sangue total foi coletado em tubos contendo heparina sódica para realização das análises hematológicas. A quantificação de proteínas totais plasmáticas foi feita no refratômetro, o hematócrito foi obtido através de leitura de capilar centrifugado, a contagem global de células nucleadas foi feita em câmara de Neubauer por meio de diluições, com o reagente líquido de Turk (4%) e a quantificação de hemoglobina foi feita pelo método colorimétrico de cianometemoglobina.

O sangue total de cinco animais de cada grupo foi escolhido e centrifugado em 900 xg por 10 minutos, com o plasma obtido foi feita a quantificação de ALT, ácido úrico e ureia pelo sistema de bioquímica integrada *Dimension Xpand Plus* (*Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, DE, US*).

4.9 ELISA DE IMUNOCAPTURA PARA CORTISOL

Para determinação dos níveis de cortisol foram escolhidos o plasma e o cérebro de cinco animais de cada grupo. Os cérebros foram coletados e armazenados a -80°C , para a realização dos testes foram macerados e centrifugados com PBS 0,01M. Foi realizado ELISA de imunocaptura com kit comercial para quantificação do cortisol (*Bioassay Technology Laboratory E0071Ch; Shanghai, CN*), conforme o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

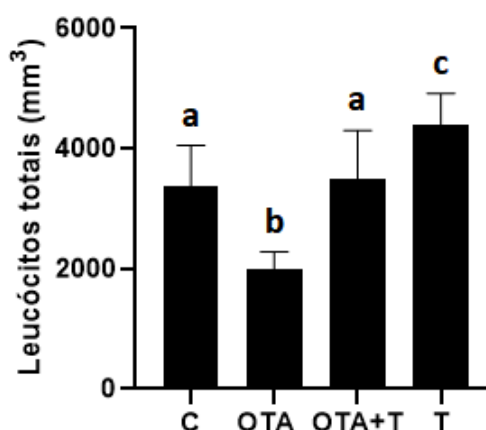
Para verificação de normalidade e homogeneidade dos grupos foi feito o teste de *Lilliefors* e de *Levene*, respectivamente. Nas variáveis em que um ou mais grupos não apresentaram normalidade foi realizada transformação estatística. Os grupos que apresentaram normalidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um fator para verificar se houve diferença significativa entre eles, seguido do teste de *Student-Newman-keus* para comparações múltiplas. Nas variáveis em que os grupos não puderam ser normalizados foi utilizado teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* para verificar se houve diferença significativa entre eles, seguido do teste de *Student-Newman-keus* para comparações múltiplas. Todos os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p\text{-valor} < 0,05$. Foi utilizado o programa *SigmaPlot 12.0* (*Systat Software Inc, 2011, San Jose, CA, US*) para a realização das análises estatísticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados dos parâmetros hematológicos, houve diminuição significativa na contagem de leucócitos totais nos animais do grupo OTA em relação ao grupo C ($p < 0,05$, gráfico 1). Outros estudos obtiveram o mesmo resultado, Khan et al. (2018) verificaram em frangos contaminados cronicamente com 0,3 a 1,1 mg/kg de OTA na dieta a diminuição dos níveis de leucócitos totais. Moura et al. (2004), também observaram diminuição de leucócitos totais em frangos, mas utilizaram outra dose de OTA (0,04 mg/kg de peso vivo) e por via intraperitoneal, e verificaram que a diminuição ocorreu no período de 6 horas após a intoxicação aguda, porém após esse período a contagem de leucócitos totais se normalizou, isso pode ter ocorrido devido à dose baixa utilizada. Como no presente estudo a contagem permaneceu diminuída após 14 dias, isso pode ter ocorrido devido a dose alta utilizada.

O tratamento com quatro doses de L-triptofano (100 mg/kg de peso vivo) levou ao aumento significativo da contagem de leucócitos totais do grupo T em relação ao grupo C e do grupo OTA+T em relação ao grupo OTA ($p < 0,05$, gráfico 1). Patil et al. (2013) verificaram a reversão dos efeitos tóxicos de Aflatoxina na resposta imune humoral e celular com a suplementação com L-triptofano (250 mg/kg de ração) na dieta de frangos. Moneva et al. (2008), observaram que o fornecimento de triptofano (5 g/kg de ração) na dieta de frangos com indução de estresse influenciou a dinâmica e os padrões de leucócitos totais. Isso pode ocorrer devido ação de 5-HT, uma substância produzida a partir do L-triptofano e que pode regular o sistema imune, pois vários receptores de 5-HT estão presentes em células imunes como linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, a 5-HT pode diminuir as taxas de apoptose dessas células e promover a produção de citocinas pró-inflamatórias e proteção contra o estresse oxidativo (KHAN; GHIA, 2010).

Gráfico 1 – Leucócitos totais circulantes em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



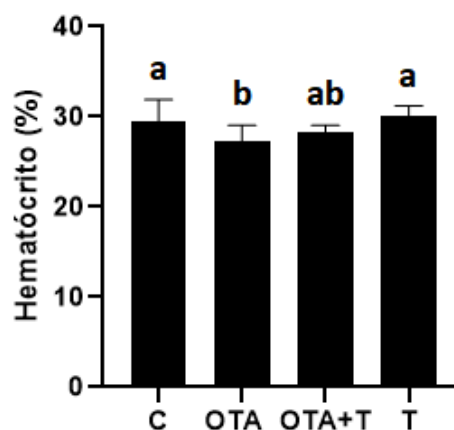
Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Houve diminuição significativa do hematócrito dos animais do grupo OTA em relação aos grupos C e T ($p < 0,05$, gráfico 2). Outros estudos também verificaram esse resultado. Elaroussi et al. (2006), observaram diminuição do hematócrito de frangos contaminados cronicamente com 0,4 e 0,8 mg/kg de OTA na dieta, por 14 dias. Isso pode ocorrer devido à indução de anemia pela inibição de absorção de ferro ou um distúrbio no sistema hematopoiético pela supressão da medula óssea (HUFF; KUBENA; HARVEY, 1988, ELAROUSHI et al., 2006, POZZO et al., 2013).

O tratamento com L-triptofano não levou a diferenças nos hematócritos dos animais do grupo OTA+T em relação ao grupo OTA ($p > 0,05$, gráfico 2), e do grupo T em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 2), isso mostra ausência de influência do L-triptofano nesse parâmetro. Contudo, seria interessante realizar estudos adicionais com maior amostragem, pois observou-se uma tendência de aumento do hematócrito do grupos OTA+T, considerando que este grupo apresentou nível similar aos grupos C e T, diferente do grupo OTA. Moneva et al. (2008), verificaram que o fornecimento de dieta rica em triptofano não levou ao aumento do hematócrito de frangos induzidos ao estresse. Não há na literatura dados mais consistentes e com a demonstração do impacto da administração oral de L-triptofano no hematócrito de frangos.

Gráfico 2 – Hematócrito em frangos de quatorze dias, desafiados com e tratados com L-triptofano.



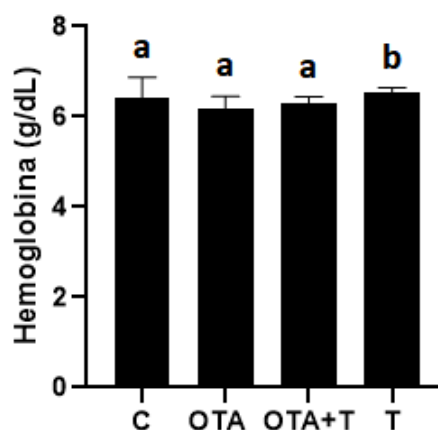
Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Os animais do grupo OTA tiveram níveis similares nos valores de hemoglobina em relação ao grupo C e OTA+T ($p > 0,05$, gráfico 3). Os valores de hemoglobina de frangos contaminados cronicamente com OTA normalmente foram diminuídos em relação aos animais não contaminados (ELAROUSSI et al., 2006). Huff, Kubena e Harvey (1988), verificaram diminuição significativa dos níveis de hemoglobina em frangos contaminados cronicamente com 1 a 4 mg/kg de OTA na dieta por 21 dias. Isso pode ter ocorrido pela utilização de dose única, diferentes de doses crônicas utilizadas em outros estudos (HUFF; KUBENA; HARVEY, 1988, ELAROUSSI et al., 2006), isso demonstra que a dose única, mesmo elevada não altera os níveis de hemoglobina.

Os animais do grupo T tiveram aumento significativo em relação aos demais grupos ($p < 0,05$, gráfico 3), portanto a suplementação com L-triptofano teve efeito positivo nos níveis de hemoglobina dos frangos. Não há na literatura estudos que demonstrem a ação da suplementação com L-triptofano com efeitos significativos nos valores de hemoglobina de frangos.

Gráfico 3 – Hemoglobina em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



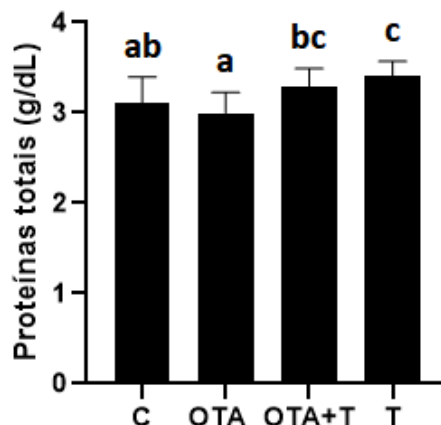
Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Os valores de proteínas totais plasmáticas expressos em g/dL, dos animais do grupo OTA, foram similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 4), possivelmente pela pequena amostragem de animais utilizada no presente estudo. Outros estudos, utilizando dietas contaminadas, verificaram a diminuição dos níveis de proteínas totais e albumina plasmáticas causadas por intoxicação crônica pela OTA, isso ocorre pelo extravasamento de albumina nos locais onde houve lesões renais, prejuízo na síntese proteica hepática e pelo mecanismo de alterações na síntese proteica pela inibição de t-RNA sintase (SAKTHIVELAN; RAO, 2010, POZZO et al., 2013, SINGH et al., 2015, QU et al., 2017, KHAN et al., 2018, RAO; VARRA; KUMAR, 2018, KHAN et al., 2019).

Os animais dos grupos tratados com L-triptofano tiveram aumento nos níveis de proteínas totais plasmáticas em relação aos grupos não tratados com L-triptofano. De forma interessante, os animais do grupo OTA+T tiveram aumento significativo em relação aos animais do grupo OTA ($p < 0,05$, gráfico 4), portanto o L-triptofano teve papel benéfico. Alguns estudos demonstram aumento dos níveis de proteínas totais plasmáticas em frangos com o fornecimento de L-triptofano acima do recomendado nas dietas (EMADI et al., 2011, PAN et al., 2013, KHATTAK; HELMBRECHT, 2019). Isso pode ocorrer devido ao aumento de síntese proteica e de crescimento celular e à diminuição de expressão de genes associados à degradação proteica devido a suplementação do L-triptofano (PAN et al., 2013, JIANG et al., 2017). Os animais do grupo T tiveram aumento significativo em relação aos grupos OTA e C ($p < 0,05$, gráfico 4), em concordância com estes dados da literatura.

Gráfico 4 – Proteínas totais plasmáticas em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

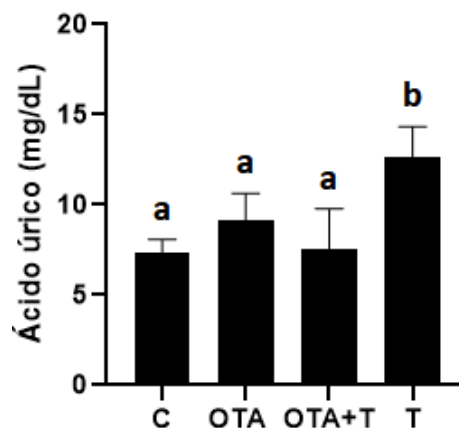
Fonte: próprio autor (2021).

Em relação ao resultado dos parâmetros bioquímicos renais, o nível de ácido úrico dos animais do grupo OTA foi similar ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 5). Outros estudos, utilizando dietas contaminadas, verificaram aumento dos níveis de ácido úrico plasmáticos com a contaminação crônica pela OTA (HUFF; KUBENA; HARVEY, 1987, SINGH et al., 2015, RAO; VARRA; KUMAR, 2018), devido à indução de lesões renais, pela exposição dos rins durante a excreção e eliminação. POZZO et al. (2013), também não verificaram um aumento dos níveis de ácido úrico em frangos expostos à baixa dosagem de OTA na dieta. Isso indica que para ocorrer uma lesão significativa com aumento dos níveis de ácido úrico é necessária uma dose mais elevada, ou disponibilizá-la por maior período de tempo.

Os animais do grupo OTA+T tiveram níveis similares de ácido úrico em relação ao grupo OTA ($p > 0,05$, gráfico 5), no entanto os níveis de ácido úrico do grupo T aumentaram significativamente em relação aos demais grupos ($p < 0,05$, gráfico 5), isso pode ter sido ocasional, porém pode ter ocorrido uma sobrecarga dos rins para excretar o excesso de L-triptofano. Liu et al. (2015), verificaram diminuição dos níveis de ácido úrico, conforme o aumento do fornecimento de triptofano na dieta, entretanto na dieta com maior concentração de triptofano os valores de ácido úrico foram maiores do que em relação ao grupo tratado com menos triptofano, portanto um nível elevado de L-triptofano causou o aumento nos níveis de ácido úrico. No presente estudo foi utilizado o L-triptofano purificado, isso pode ter aumentado a disponibilidade do

aminoácido no organismo dos animais e possivelmente causado maior efeito colateral, para confirmar essa possibilidade são necessários estudos adicionais com diferentes doses de L-triptofano e análise histopatológica dos órgãos.

Gráfico 5 – Ácido úrico em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

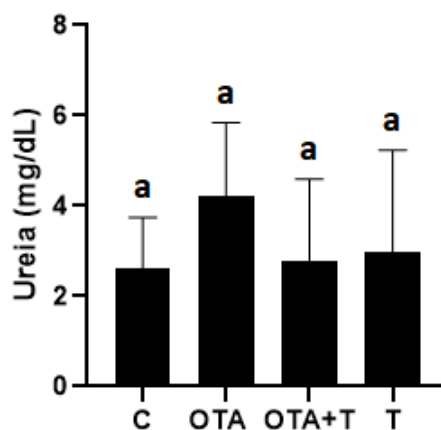
Fonte: próprio autor (2021).

Os níveis de ureia dos animais do grupo OTA foram similares ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 6). Outros estudos, ao utilizar dietas contaminadas com diferentes concentrações, observaram diminuição nos valores de ureia plasmática na intoxicação crônica pela OTA (HUFF; KUBENA; HARVEY, 1987, KUBENA et al., 1988, QU et al., 2017), porém o mecanismo pelo qual ocorre a diminuição de ureia plasmática não está elucidado, possivelmente devido à lesões hepáticas, portanto no presente estudo o resultado também pode ter sido ocasional, devido ao baixo número de animais em cada grupo, quando comparado à outros trabalhos existentes na literatura. A avaliação de ureia plasmática em aves é mais relacionada aos níveis de desidratação do que a função renal dos animais (HARRIS, 2009), no presente experimento os animais de todos os grupos tiveram a mesma disponibilidade de água, portanto os níveis de desidratação provavelmente não influenciaram nos resultados.

Os grupos tratados com L-triptofano tiveram níveis de ureia semelhantes ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 6), isso mostra que o L-triptofano não teve influência nesse parâmetro. Liu et al. (2015) verificaram em patos suplementados na dieta com maiores níveis de triptofano diminuição dos níveis de ureia, isso pode ter ocorrido devido à melhora na eficiência de utilização do aminoácido ou à redução do catabolismo

proteico dos animais. Não há na literatura dados mais consistentes sobre a influência do fornecimento de L-triptofano nos níveis de ureia plasmática dos frangos.

Gráfico 6 – Ureia em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



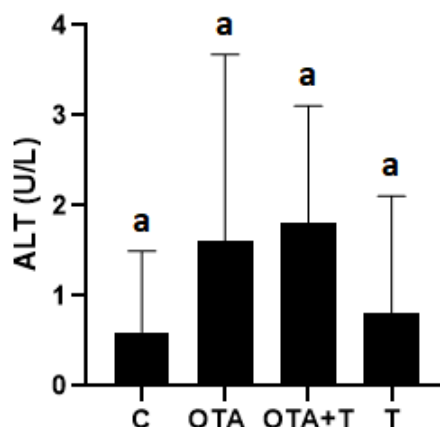
Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Em relação a avaliação hepática, os níveis de ALT plasmáticos dos animais do grupo OTA foram similares ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 7). Outros estudos verificaram aumento dos níveis de ALT plasmáticos com a contaminação crônica pela OTA (QU et al., 2017, RAO; VARRA; KUMAR, 2018), isso é devido ao dano hepático causado pela OTA, com alteração da membrana dos hepatócitos e extravasamento das suas enzimas e pela hiperplasia biliar (RAO; VARRA; KUMAR, 2018). Entretanto, POZZO et al. (2013), ao utilizar uma dose baixa de OTA, no limite do recomendado pela União Europeia para ração (0,1 mg/kg), verificaram que os níveis de ALT dos frangos contaminados com OTA foram similares aos animais não contaminados, isso mostra que para causar lesão hepática é necessário fornecimento de OTA em maiores concentrações, e uma dose única, mesmo alta não é suficiente.

Os animais do grupo OTA+T tiveram níveis similares de ALT em relação ao grupo OTA ($p > 0,05$, gráfico 7), e o grupo T teve níveis similares em relação aos grupos OTA e OTA+T ($p > 0,05$, gráfico 2C), esses resultados estão de acordo com outros estudos. Emadi et al. (2011) e Khattak et al. (2018) também não verificaram alterações nos níveis de ALT e AST, respectivamente, em frangos suplementados com triptofano em relação aos frangos não suplementados com triptofano.

Gráfico 7 – ALT em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

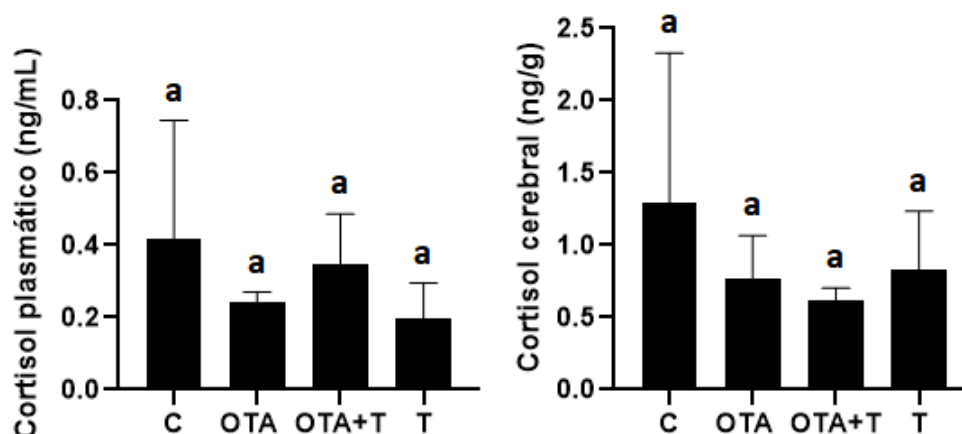
Fonte: próprio autor (2021).

Em relação ao cortisol plasmático, os animais do grupo OTA tiveram níveis similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 8), isso pode ter ocorrido devido ao baixo número de animais utilizados, ou devido à única dose administrada, e possível reversão após 14 dias de intoxicação. Kumar et al. (2011), verificaram a diminuição dos níveis de cortisol plasmáticos com exposição crônica com 4 mg/kg de OTA na dieta de ratos, possivelmente devido aos prejuízos causados pela OTA no sistema endócrino, mas os mecanismos pelo qual isso ocorre não são conhecidos. Não há na literatura mais dados que correlacionam a exposição pela OTA aos níveis de cortisol plasmáticos de frangos. Em relação ao cortisol cerebral, os animais do grupo OTA tiveram níveis similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 8), não se conhece os efeitos da OTA nos níveis de cortisol cerebral de frangos, esse foi o primeiro estudo a quantificar os níveis de cortisol no cérebro de frangos. O cortisol é um glicocorticoide secretado pela glândula adrenal das aves durante os períodos embrionários e após o nascimento, diminuindo com o passar do tempo, porém ainda em concentrações elevadas até o décimo quarto dia de vida dos frangos (CARSIA, 2015).

Os animais dos grupos tratados com L-triptofano tiveram níveis similares de cortisol plasmático e cerebral em relação aos outros grupos ($p > 0,05$, gráfico 8). Outros estudos realizaram a suplementação de triptofano na dieta de suínos em desmame e verificaram uma diminuição significativa dos níveis de cortisol salivar, isso pode estar relacionado ao aumento dos níveis de 5-HT e diminuição do estresse dos animais (KOOPMANS et al., 2006, LIU et al., 2013). Não há na literatura dados sobre os efeitos

da administração de L-triptofano nos níveis plasmáticos e cerebrais de cortisol em frangos, é necessário no futuro avaliar os mecanismos de efeito do L-triptofano nesse parâmetro.

Gráfico 8 – Cortisol plasmático e cerebral em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

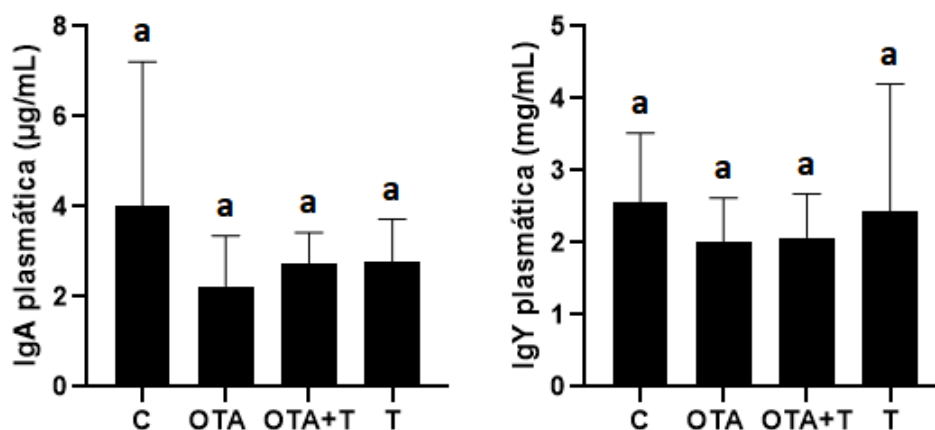
Fonte: próprio autor (2021).

Os níveis de IgA/IgY plasmáticas dos animais do grupo OTA foram similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 9). A OTA pode causar imunossupressão nos animais, diversos estudos que utilizaram diferentes concentrações demonstraram a depleção de imunoglobulinas (IgA/IgY), leucócitos e linfócitos B produtores de anticorpos circulantes causadas pela OTA, isso ocorre devido a degeneração nos tecidos linfoides de timo, baço e bursa de Fabricius, devido ao aumento das taxas de apoptose e inibição de proliferação celular com consequente diminuição do peso relativo desses órgãos (ELAROUSSI et al., 2006, POZZO et al., 2013, SHARMA et al., 2016, KHAN et al., 2018, KHAN et al., 2019). Contudo, no presente estudo os níveis similares podem ser devido a administração de dose única, o que pode ter sido insuficiente para diminuir os níveis de linfócitos B circulantes, e consequentemente de IgA/IgY plasmática, ou porque após 14 dias de contaminação os níveis de IgY maternos estariam extremamente baixos.

Os grupos tratados com L-triptofano apresentaram níveis similares de IgA/IgY plasmáticas em relação ao grupo OTA e C ($p > 0,05$, gráfico 9), isso demonstra que o tratamento com L-triptofano não teve efeitos na produção de IgA/IgY circulantes.

Emadi et al. (2011), verificaram que frangos suplementados com uma dieta com altos níveis de triptofano tiveram níveis de IgY circulantes maiores que frangos não suplementados, após 27 dias de experimento, contudo, Patil et al. (2019), verificaram com a suplementação de 250 mg/kg de L-triptofano na ração ausência de efeitos quando comparados com o grupo controle na titulação de anticorpos quando utilizado o teste de hemaglutinação, porém a suplementação de L-triptofano foi capaz de inibir a diminuição dos títulos de anticorpos causados pela Aflatoxina. El-Gogary e Azzam (2014), não observaram aumento nos níveis de imunoglobulinas em frangos suplementados com L-triptofano na dieta em relação aos animais do grupo controle. Fatemi e Toghyani (2018), não observaram aumento dos títulos de anticorpos de frangos quando utilizado o teste de hemaglutinação e número de linfócitos em relação aos heterófilos em animais com fornecimento de triptofano na dieta relação ao grupo controle. Os dados obtidos no presente estudo estão de acordo com El-Gogary e Azzam (2014), e sugere que o L-triptofano não altera os níveis de imunoglobulinas circulantes.

Gráfico 9 – IgA/IgY plasmática em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

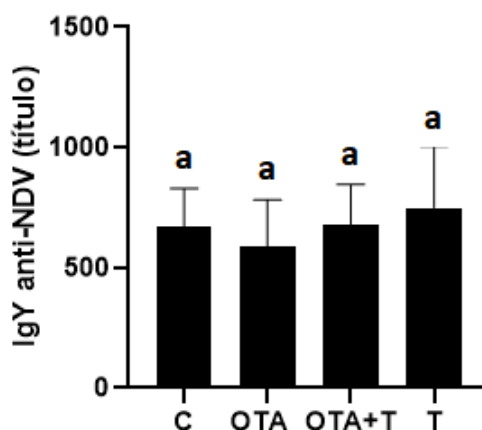
Fonte: próprio autor (2021).

Os títulos vacinais de IgY anti-NDV provenientes de matrizes dos animais do grupo OTA foram similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 10). Santin et al. (2002), verificaram em frangos vacinados com a vacina contra NDV (cepa LaSota) diminuição dos títulos de anticorpos de vacina quando contaminados com a OTA. Stoev et al. (2000), também verificou diminuição dos títulos de vacina no mesmo teste,

em frangos imunizados contra NDV e contaminados com OTA, porém nesses dois estudos os animais foram vacinados durante o experimento, e no presente estudo verificou-se apenas os títulos de anticorpos passados das matrizes vacinadas para os pintainhos. Possivelmente a diminuição dos títulos vacinais está associada ao mesmo mecanismo de imunossupressão, que causa diminuição das imunoglobulinas totais plasmáticas. No presente estudo, uma dose alta não foi suficiente para diminuir os títulos vacinais provenientes das matrizes, possivelmente porque a diminuição dos linfócitos B causados pela OTA, não seria causadora de diminuição dos anticorpos já presentes nos animais.

Os animais dos grupos tratados com L-triptofano tiveram níveis similares de títulos vacinais em relação aos grupos não tratados com L-triptofano ($p > 0,05$, gráfico 10). Fatemi e Toghyani (2018), verificaram que o fornecimento de triptofano na dieta de frangos não alterou os títulos vacinais contra NDV e vírus da Influenza, em animais vacinados durante o experimento. Mais estudos são necessários para se determinar a influência da suplementação de L-triptofano com títulos vacinais em frangos, devido à escassez de trabalhos existentes.

Gráfico 10 – Títulos vacinais anti-NDV maternos em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

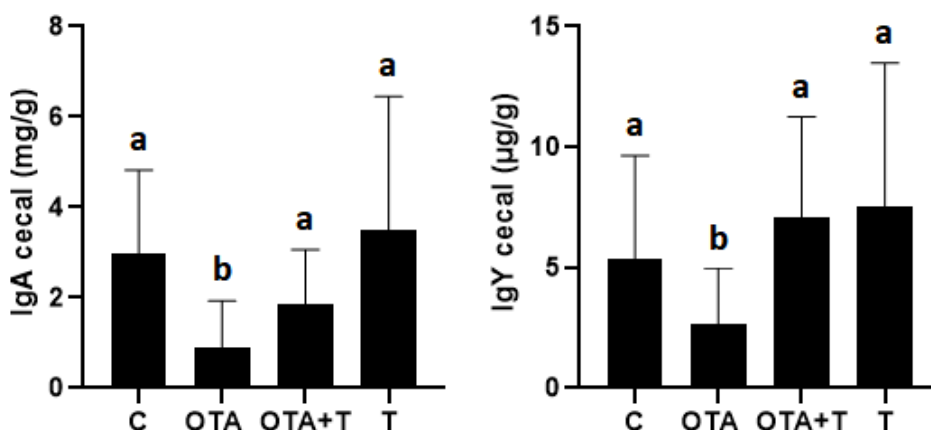
Fonte: próprio autor (2021).

Os animais do grupo OTA tiveram diminuição significativa dos níveis de IgA/IgY cecal em relação aos demais grupos ($p > 0,05$, gráfico 11). Este é o primeiro estudo a quantificar os níveis de IgA/IgY do conteúdo cecal de frangos contaminados com OTA, foi verificado que a OTA possui a capacidade de causar imunossupressão do sistema

imunológico associado à toda mucosa intestinal, pois possivelmente o conteúdo presente no ceco representa o resultado geral de produção da mucosa do intestino. Esse resultado, mais significativo de que os níveis de IgA/IgY plasmáticas, pode ter ocorrido devido à alguns fatores: alta dose utilizada (1,4 mg/kg de peso vivo), pois cerca de 40% da OTA é absorvida no trato gastrointestinal superior; não absorção de parte da OTA, que permaneceu em contato com a mucosa e a recirculação entero-hepática, que aumenta a exposição do trato gastrointestinal à OTA (GRENIER; APPLGATE, 2013); idade dos animais, pois os pintainhos de um dia de idade ainda não possuem a mucosa intestinal e sistema imunológico totalmente desenvolvidos; e via de administração utilizada (oral por gavagem), com maior exposição do trato gastrointestinal, pois a administração oral através de alimentos contaminados pode diminuir a absorção pelos animais (DEVREESE et al., 2018, EL CAFSI et al., 2019).

Os animais dos grupos tratados com L-triptofano tiveram níveis de IgA/IgY cecal semelhantes em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 11), isso mostra que a suplementação com L-triptofano inibiu os efeitos tóxicos da OTA na imunidade local. Donato et al. (2015), verificaram que o 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor de 5-HT produzida nas células enterocromafins, quando inoculado via intraperitoneal em frangos, possui tropismo na mucosa intestinal, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes e o desempenho dos animais, e isso é favorável para o desenvolvimento do sistema imunológico. Iken et al. (1995), verificaram que a 5-HT pode aumentar a proliferação de linfócitos B estimulados por mitógenos, via receptor 5-HT_{1A}. A 5-HT também possui atividade antioxidante, revertendo o mecanismo de produção de ROS da OTA, ao induzir a atividade oxidativa e levar a morte de células do sistema imune associadas à mucosa intestinal (KHAN; GHIA, 2010). Wu et al. (2018), observaram em frangos alimentados com ração deficiente do aminoácido metionina redução significativa de imunoglobulinas IgA/SIgA/IgY/IgM no duodeno e jejuno após 28 dias, isso mostra que os aminoácidos essenciais são limitantes para a síntese proteica e para a imunidade local, portanto, a suplementação com L-triptofano pode ser uma alternativa para aumentar a produção de imunoglobulinas localmente.

Gráfico 11 – IgA/IgY cecal em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA (e tratados com L-triptofano).



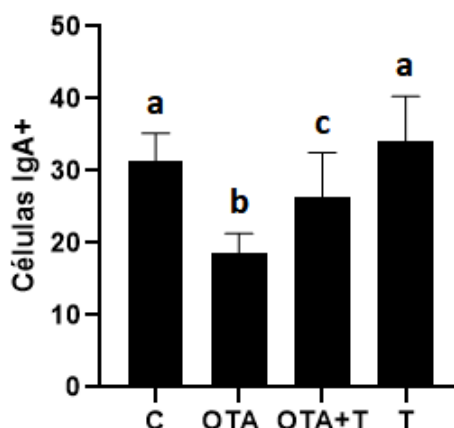
Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Os animais do grupo OTA tiveram diminuição significativa na contagem de células IgA⁺ do duodeno em relação as demais grupos ($p < 0,05$, gráfico 12). Isso confirma a imunossupressão causada pela OTA na mucosa, pois a diminuição de linfócitos produtores de anticorpos afeta os níveis IgA/IgY locais. O IgA é a principal anticorpo de defesa presente no trato gastrointestinal, entre suas funções está a prevenção de influxo de antígenos do ambiente para os compartimentos internos, neutralização de vírus e toxinas microbianas e prevenção de aderência e colonização da mucosa intestinal por patógenos (LILLEHOJ; TROUT, 1996).

Os animais dos grupos OTA+T e T tiveram aumento significativo em relação ao grupo OTA ($p < 0,05$, gráfico 12), e o grupo T teve números similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 12) na contagem de células IgA⁺ do duodeno. Isso demonstra inibição dos efeitos da intoxicação aguda pela OTA na mucosa local pelo L-triptofano, através dos mecanismos já citados, confirmados pelo aumento dos níveis de IgA/IgY cecal no presente estudo em relação ao grupo OTA. Wu et al. (2018), verificaram que frangos alimentados com dieta deficiente do aminoácido metionina apresentaram contagens diminuídas de linfócitos IgA⁺ no duodeno e no jejuno após 28 dias. Embora no presente estudo, tenha sido feito imunohistoquímica apenas do duodeno, possivelmente os mesmos resultados estão presentes em toda a extensão intestinal, devido à alta dose fornecida aos animais e presença da OTA nesse mucosa, devido aos mecanismos já citados.

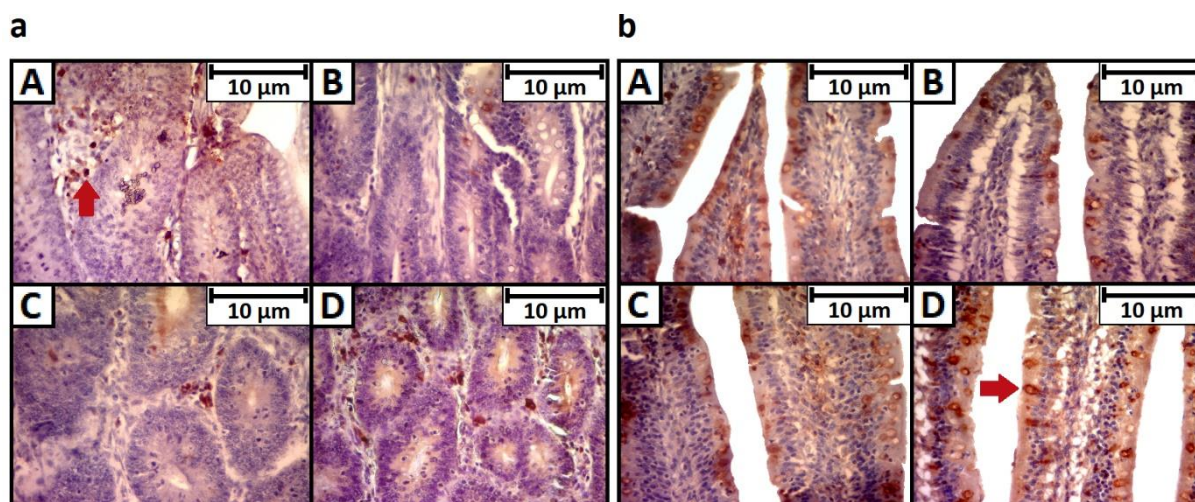
Gráfico 12 – Células IgA⁺ duodenais em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Figura 4 – a) criptas e b) vilosidades do duodeno em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Células IgA⁺ marcadas por imunohistoquímica (nas setas) e contracoloração com hematoxilina de Harris (aumento de 400x). A: grupo C, B: grupo OTA, C: grupo OTA+T, D: grupo T.

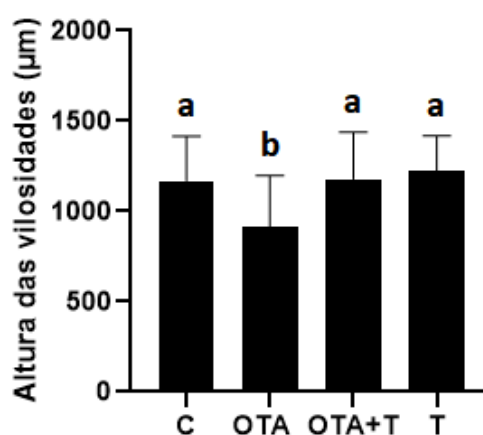
Fonte: próprio autor (2021).

Em relação à morfometria do duodeno, os animais do grupo OTA tiveram diminuição significativa na altura das vilosidades do duodeno em relação aos demais grupos ($p < 0,05$, gráfico 13). Sharma et al. (2016) e Solcan et al. (2015), verificaram com a contaminação crônica da OTA diminuição da altura das vilosidades do duodeno e jejuno, isso ocorre devido aos mecanismos de citotoxicidade, ao estímulo da apoptose celular e diminuição da síntese de proteínas relacionados aos genes de junção das

células no intestino, predispondo ao aumento de permeabilidade da barreira intestinal, inflamação e invasão de bactérias patogênicas.

Os animais do grupo OTA+T tiveram um aumento significativo na altura das vilosidades em relação ao grupo OTA ($p < 0,05$, gráfico 13) e níveis similares em relação ao grupo C ($p > 0,05$, gráfico 13), os animais do grupo T teve um aumento significativo em relação ao grupo OTA ($p < 0,05$, gráfico 13) e níveis similares em relação aos grupos C e OTA+T ($p > 0,05$, gráfico 13). Tossou et al. (2016) e Fatemi e Toghyani (2018), verificaram com a suplementação com 0,15% de triptofano na dieta de suínos e frangos que não houve diferenças significativas nas vilosidades do duodeno, jejuno e íleo em relação aos grupos controles, isso mostra ausência de influência do L-triptofano nesse parâmetro. No presente estudo observou-se que o L-triptofano pode melhorar os efeitos da OTA na altura das vilosidades do duodeno, porém além dos já citados, não há na literatura outros estudos que utilizaram o L-triptofano para melhorar os efeitos da OTA na morfometria intestinal de frangos.

Gráfico 13 – Altura das vilosidades do duodeno em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análise estatística: ANOVA e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

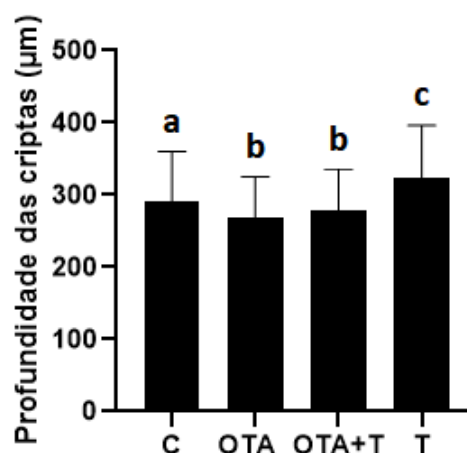
Fonte: próprio autor (2021).

Os animais do grupo OTA tiveram diminuição significativa na profundidade das criptas do duodeno em relação ao grupo C ($p < 0,05$, gráfico 14). Sharma et al. (2016) e Solcan et al. (2015), observaram que a contaminação crônica da OTA predispõe ao aumento das criptas em toda a extensão do intestino após 14 dias, isso se deve à maior proliferação celular nas criptas para compensar a diminuição das vilosidades.

No presente estudo, os resultados mostraram uma possível inibição de proliferação celular das criptas do duodeno pela alta dose utilizada e na forma aguda, mas ainda são necessários mais estudos para verificar se existe essa relação.

Os animais do grupo OTA+T tiveram níveis similares em relação ao grupo OTA ($p>0,05$, gráfico 14), e os animais do grupo T tiveram aumento significativo em relação aos demais grupos ($p<0,05$, gráfico 14). Tossou et al. (2016), verificaram aumento da profundidade das criptas de no jejuno de suínos com a suplementação de triptofano na dieta, porém Fatemi et al. (2018), verificaram que a suplementação com triptofano na dieta não aumentou a profundidade das criptas no jejuno de frangos. Portanto, não existe um consenso sobre os efeitos da ingestão de triptofano na profundidade das criptas intestinais em frangos. Sabe-se que a ingestão de dieta com baixos níveis de aminoácidos causa degeneração no tecido intestinal com alterações na morfometria, porém não está claro se o excesso de fornecimento de aminoácidos, acima dos níveis recomendados para a espécie, tem efeito benéfico nesses parâmetros.

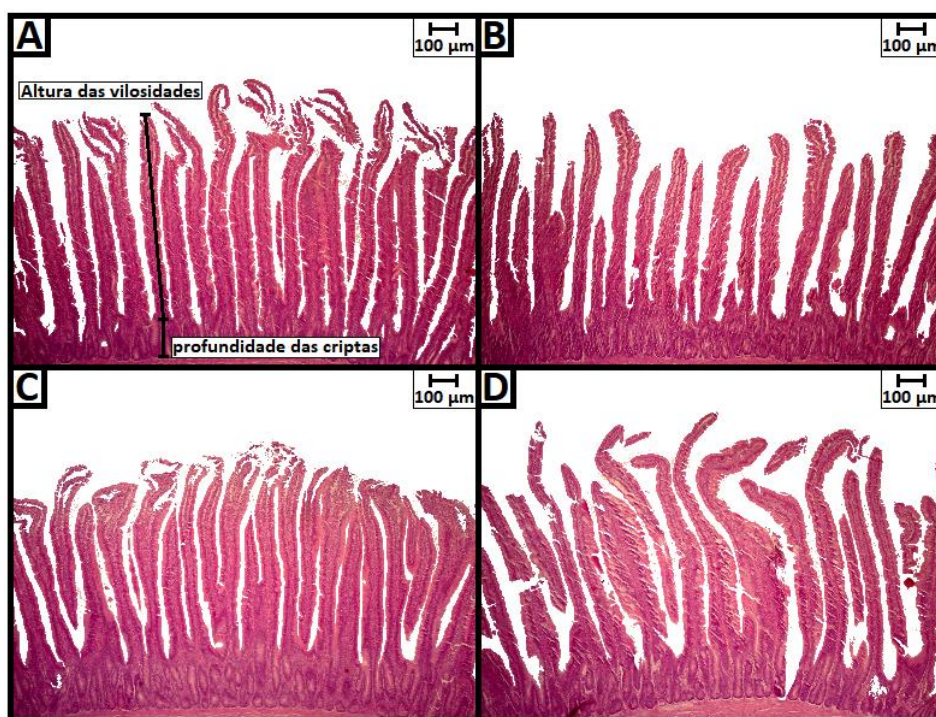
Gráfico 14 – Profundidade das criptas do duodeno em frangos de quatorze dias, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Média + desvio padrão. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p<0,05$). Análise estatística: Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keus (*post hoc*).

Fonte: próprio autor (2021).

Figura 5 – Criptas e vilosidades duodenais de frangos de quatorze dias de idade, desafiados com OTA e tratados com L-triptofano.



Coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 40x). A: grupo C, B: grupo OTA, C: grupo OTA+T, D: grupo T.

Fonte: próprio autor (2020).

Embora a exposição aguda seja considerada mais leve do que a exposição na forma crônica ou subcrônica (O'BRIEN; DIETRICH, 2005), no presente estudo mesmo com utilização de dose única (1,4 mg/kg de peso vivo) no primeiro dia de vida, foi possível observar prejuízos na saúde dos animais. Os principais efeitos nocivos foram na mucosa local, com os parâmetros relacionados ao sistema imune associado e à morfometria intestinal, com diminuição da produção de anticorpos IgA/IgY, diminuição do número de células IgA⁺ e da altura das vilosidades na mucosa intestinal. Contudo, uma dose alta não foi suficiente para diminuir os níveis de IgA/IgY circulantes e títulos vacinais contra NDV, embora tenha causado a diminuição dos leucócitos totais e do hematócrito, demonstrando efeitos na hematopoiese, e também não foi suficiente para aumentar os níveis plasmáticos de ALT, ureia e ácido úrico, e também de proteínas totais plasmáticas e hemoglobina.

Foi feita a análise de tratamento inovador com L-triptofano (100 mg/kg de peso vivo) em quatro doses diárias subsequentes à intoxicação pela OTA. Embora existam diversos estudos com avaliação dos efeitos da suplementação de triptofano na dieta de frangos nos parâmetros de produção e do sistema imune, no presente estudo foi

utilizado o L-triptofano purificado, para determinar com maior precisão quais seus reais efeitos nos animais. Com este tratamento foi verificada melhora nos parâmetros relacionados à mucosa intestinal, como o sistema imune associado a mucosa e com o aumento de superfície de absorção verificado pelo aumento da altura das vilosidades, mesmo no grupo exposto anteriormente à OTA, contudo esse tratamento não levou ao aumento de anticorpos IgA/IgY circulantes e títulos vacinais contra NDV, embora tenha levado ao aumento dos leucócitos totais e proteínas totais plasmáticas. Também não trouxe efeitos benéficos nos níveis de enzimas marcadoras de lesões renal e hepática, como ALT, ureia e ácido úrico, contudo são necessários estudos adicionais com mais marcadores funcionais e análise histopatológica desses órgãos.

Portanto, verifica-se que uma dose ocasional de OTA, fornecida no primeiro dia de vida dos pintainhos pode causar prejuízos na mucosa intestinal e na hematopoiese, mas não possui efeitos em outros parâmetros clínicos, sendo necessário para isso uma dose maior ou exposição por maior período de tempo.

Verifica-se também que o tratamento utilizado com L-triptofano pode melhorar os prejuízos causados pela OTA na mucosa intestinal, mas com menos efeitos nos parâmetros clínicos dos animais contaminados. Embora tenha sido observado aumento no nível de ácido úrico como efeito colateral do tratamento com L-triptofano, possivelmente isso não deve apresentar consequências maiores, pois os demais marcadores bioquímicos não foram afetados. Os benefícios do L-triptofano, como neutralização dos efeitos prejudiciais da OTA, aumento nos níveis de leucócitos totais circulantes, hemoglobina, proteínas totais plasmáticas e no número de células IgA⁺ no duodeno, supera o possível efeito colateral, que deve ser melhor investigado.

6 CONCLUSÕES

Uma dose ocasional de OTA, fornecida no primeiro dia de vida dos pintainhos:

1) Pode causar danos na mucosa intestinal, com alterações na altura das vilosidades e profundidade das criptas, diminuição dos níveis de IgA/IgY e número de células produtoras de IgA.

2) Pode causar diminuição nos níveis de leucócitos e hematócritos circulantes, o que sugere possível ação danosa da OTA na hematopoiese.

3) Não induz alterações em níveis circulantes de hemoglobina, proteínas totais plasmáticas, ácido úrico, ureia, ALT, IgA/IgY plasmáticas, IgY anti-NDV materna e em níveis de cortisol plasmático e cerebral, isso sugere que não afeta as funções renal, hepática, endócrina e do sistema imune sistêmico. Contudo, são necessários estudos adicionais com maior amostragem.

O tratamento de pintainhos expostos à OTA e tratados com L-triptofano:

4) Pode neutralizar os efeitos danosos da OTA na mucosa intestinal, ao normalizar a altura das vilosidades, níveis de IgA/IgY fecais e aumentando o número de células produtoras de IgA no duodeno.

O tratamento de pintainhos saudáveis com L-triptofano:

5) Pode induzir aumento nos níveis de leucócitos totais circulantes, hemoglobina, proteínas totais plasmáticas e aumento da profundidade das criptas do duodeno, o que mostra um efeito benéfico aos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PULINA, G. Effects of ochratoxin A on livestock production. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1796-1824, 2010.
- BIRÓ, K.; SOLTÍ, L.; BARNA-VETRÓ, I.; BAGÓ, G.; GLÁVITS, R.; SZABÓ, E.; FINK-GREMMELS, J. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. **Avian Pathology**, v. 31, n. 2, p. 141-148, 2002.
- BRUININK, A.; SIDLER, C. The neurotoxic effects of ochratoxin-A are reduced by protein binding but are not affected by l-phenylalanine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 146, n. 2, p. 173-179, 1997.
- CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1111-1120, 2010.
- CARSIA, R. V. Adrenals. In: SCANES, C. G. **Sturkie's Avian Physiology**. 6ª edição. Academic Press, 2015, p. 577-611.
- CASTEGNARO, M.; BAREK, J.; FRÉMY, J. M.; LAFONTEINE, M.; MIRAGLIA, M.; SANSONE, E. B.; TELLING, G. M., Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: Some Mycotoxins. **IARC Scientific Publications**, n. 113, p. 9-16, 1991.
- CREPPY, E. E.; RÖSCHENTHALER, R.; DIRHEIMER, G. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 11, p. 883-886, 1984.
- DEVREESE, M.; CROUBELS, S.; DE BAERE, S.; GEHRING, R.; ANTONISSEN, G. Comparative toxicokinetics and plasma protein binding of ochratoxin A in four avian species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 2129-2135, 2018.
- DONATO, T. C.; BAPTISTA, A. A. S.; SMANIOTTO, B. D.; GARCIA, K. C.; OKAMOTO, A. S.; SEQUEIRA, J. L.; FILHO, R. L. A. Avaliação dos efeitos de 5-hidroxitriptofano em-hidroxibenzilhidrazine associados a *Lactobacillus* spp. na morfometria intestinal e imunomarcção de serotonina em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteridis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 677-684, 2015.
- DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 187-198, 2010.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of Ochratoxin A: a review of the worldwide status. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 10, p. 1440-1450, 2010.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 1-2, p. 1-13, 2011.

DWIVEDI, P.; BURNS, R. B. Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks. **Research in Veterinary Science**, v. 36, n. 1, p. 117-121, 1984.

EL CAFSI, I.; BJEUI, S.; RABEH, I.; NECHI, S.; CHELBI, E.; EL CAFSI, M.; GHRAM, A. Effects of ochratoxin A on membrane phospholipids of the intestine of broiler chickens, practical consequences. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 933-941, 2019.

EL-GOGARY, M.R.; AZZAM, M. M. Effects of dietary tryptophan levels and stocking density during the growing-finishing phase on broiler performance and immunity. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 9, p. 568-577, 2014.

ELAROSSI, M. A.; MOHAMED, F. R.; EL BARKOUKY, E. M.; ATTA, A. M.; ABDU, A. M.; HATAB, M. H. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 35, n. 4, p. 263-269, 2006.

ELAROSSI, M. A.; MOHAMED, F. R.; ELGENDY, M. S., EL BARKOUKY; E. M., ABDU, A. M.; HATAB, M. H. Ochratoxicosis in broiler chickens: functional and histological changes in target organs. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 5, p. 414-422, 2008.

EMADI, M.; JAHANSHIRI, F.; KAVEH, K.; HAIR-BEJO, M.; IDERIS, A.; ALIMON, A. R. Nutrition and immunity: the effects of the combination of arginine and tryptophan on growth performance, serum parameters and immune response in broiler chickens challenged with infectious bursal disease vaccine. **Avian Pathology**, v. 40, n. 1, p. 63-72, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No. 472/2002 of 12 March 2002. Amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 50, p. 18-20, 2002.

FATEMI, M.; TOGHYANI, M. Effect of Tryptophan Supplementation in Protein Deficient Diets on Performance, Gut Development and Immune Responses in Broiler Chickens. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 8, n. 1, p. 101-108, 2018.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F., SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 1, p. 23-43, 2004.

GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J. L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 19, p. 735-738, 1981.

GEISEN, R.; SCHMIDT-HEYDT, M.; STOLL, D.; TOUHAMI, N. Aspects of the occurrence, genetics, and regulation of biosynthesis of the three food relevant *Penicillium* mycotoxins: ochratoxin A, citrinin, and patulin. In: ANKE, T.; SCHÜFLER, A. **The mycota XV: Physiology and Genetics**. 2ª edição. Springer International Publishing, 2018. p. 413-433.

GRENIER, B.; APPEGATE, T. J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 396-430, 2013.

HAMEED, M. R.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; KHAN, A.; AKHTAR, M.; HASSAN, Z. U., HUSSAIN, Z. Study of ochratoxin A (OTA)-induced oxidative stress markers in broiler chicks. **Toxin Reviews**, v. 36, n. 4, p. 270-274, 2017.

HARRIS, D. J. Clinical tests. In: TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. **Handbook of Avian Medicine**. 2ª edição. Saunders Ltd., 2009, p. 77-84.

HOGLUND, E., ØVERLI, Ø., WINBERG, S. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: a comparative review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 158, 2019.

HUFF, W. E., CHANG, C. F., WARREN, M. F., HAMILTON, P. B. Ochratoxin A-induced iron deficiency anemia. **Applied and environmental microbiology**, v. 37, n. 3, p. 601-604, 1979.

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 67, n. 8, p. 1139-1146, 1988.

HUFFMAN, J.; GERBER, R.; DU, L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 764-776, 2010.

IKEN, K.; CHHENG, S.; FARGIN, A.; GOULET, A. C.; KOUASSI, E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT1A receptors. **Cellular Immunology**, v. 163, n. 1, p. 1-9, 1995.

JEEVANA, L. M.; SRIKANTH, M. K.; CH, S.; NARASIMHA, R. Y. A study on toxic biochemical effects of dietary ochratoxin and Citrinin combination in broiler chicken. **The Pharma Innovation**, v. 6, n. 9, p. 400-403, 2017.

JIANG, S. Q.; GOU, Z. Y.; LIN, X. J.; LI, L. Effects of dietary tryptophan levels on performance and biochemical variables of plasma and intestinal mucosa in yellow-feathered broiler breeders. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. e387-e394, 2017.

KHAN, W. I.; GHIA, J. E. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 161, n. 1, p. 19-27, 2010.

KHAN, A.; AALIM, M. M.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; HE, C.; KHATOON, A.; GUL, S. T. Amelioration of immunosuppressive effects of aflatoxin and ochratoxin A in White Leghorn layers with distillery yeast sludge. **Toxin Reviews**, v. 36, n. 4, p. 275-281, 2017.

KHAN, S. A., VENANCIO; E. J., FERNANDES; E. V., HIROOKA, E. Y.; OBA, A.; FLAIBAN, K. K. M. C.; ITANO, E. N. Low doses of ochratoxin-A decrease IgY and IgA production in broiler chicks. **Toxins**, v. 10, n. 8, p. 316, 2018.

KHAN, S. A.; VENANCIO, E. J.; ONO, M. A.; FERNANDES, E. V.; HIROOKA, E. Y.; SHIMIZU, C. F.; OBA, A.; FLAIBAN, K. K. M. C.; ITANO, E. N. Effects of subcutaneous ochratoxin-A exposure on immune system of broiler chicks. **Toxins**, v. 11, n. 5, p. 264, 2019.

KHANEGHAH, A. M.; FAKHRI, Y.; RAEISI, S.; ARMOON, B.; SANT'ANA, A. S. Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: a systematic review and meta-analysis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 830-848, 2018.

KHATOON, A.; ABIDIN, Z. An extensive review of experimental ochratoxicosis in poultry: I. Growth and production parameters along with histopathological alterations. **World's Poultry Science Journal**, v. 74, n. 4, p. 627-646, 2018.

KHATTAK, F.; HELMBRECHT, A. Effect of different levels of tryptophan on productive performance, egg quality, blood biochemistry, and caecal microbiota of hens housed in enriched colony cages under commercial stocking density. **Poultry Science**, v. 98, n. 5, p. 2094-2104, 2019.

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

KOOPMANS, S. J.; GUZIK, A. C.; VAN DER MEULEN, J.; DEKKER, R.; KOGUT, J.; KERR, B. J.; SOUTHERN, L. L. Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 963-971, 2006.

KÓSZEGI, T., POÓR; M. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 111.

KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; HARVEY, R. B.; CORRIER, D. E.; PHILLIPS, T. D.; CREGER, C. R. Influence of ochratoxin A and Deoxynivalenol on growing broiler chicks. **Poultry Science**, v. 67, n. 2, p. 253-260, 1988.

KUMAR, S. N.; TELANG, A. G.; SINGH, K. P.; JAIN, A. K.; AFROZ, M.; PATILI, R. D. Experimentally induced toxicity of ochratoxin A and endosulfan in male wistar rats: a hormonal disorder. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 13, p. 1750-1755, 2011.

- KYPRIANOU, M. European Commission: Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). **Official Journal of the European Communities**, v. 229, p. 7-9, 2006.
- LAN, M.; ZHANG, Y.; WAN, X.; PAN, M. H.; XU, Y.; SUN, S. C. Melatonin ameliorates ochratoxin A-induced oxidative stress and apoptosis in porcine oocytes. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113374, 2020.
- LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3630-3635, 2001.
- LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 349-360, 1996.
- LIU, H. W.; SHI, B. M.; LIU, D. S.; SHAN, A. S. Supplemental dietary tryptophan modifies behavior, concentrations of salivary cortisol, plasma epinephrine, norepinephrine and hypothalamic 5-hydroxytryptamine in weaning piglets. **Livestock Science**, v. 151, n. 2-3, p. 213-218, 2013.
- LIU, Y.; YUAN, J. M.; ZHANG, L. S.; ZHANG, Y. R.; CAI, S. M.; YU, J. H.; XIA, Z. F. Effects of tryptophan supplementation on growth performance, antioxidative activity, and meat quality of ducks under high stocking density. **Poultry Science**, v. 94, n. 8, p. 1894-1901, 2015.
- MALIR, F.; OSTRY, V.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MALIR, J.; TOMAN, J. Ochratoxin A: 50 years of research. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 191, 2016.
- MARESCA, M.; MAHFOUD, R.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; FANTINI, J. The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion. **Toxicology and applied pharmacology**, n. 176, v. 1, p. 54-63, 2001.
- MEISNER, H.; CHAN, S. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. **Biochemistry**, v. 13, n. 14, p. 2795-2800, 1974.
- MILIĆEVIĆ, D.; JOVANOVIĆ, M.; MATEKALO-SVERAK, V.; RADICEVIĆ, T.; PETROVIĆ, M. M.; LILIĆ, S. A survey of spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in chicken tissues and concurrence with histopathological changes in liver and kidneys. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 29, n. 2, p. 159-175, 2011.
- MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, n. 4, p. 247-265, 2003.

MONEVA, P.; POPOVA-RALCHEVA, S.; GUDEVA, D.; SREDKOVA, V.; YANCHEV, I. Study on the metabolic implication of supplemental tryptophan in exposed to stress chickens. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 4, p. 424-431, 2008.

MOURA, M. A.; MACHADO, C. H.; PORFÍRIO, L. C.; FREIRE, R. B. Effects of ochratoxin a on broiler leukocytes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 3, p. 187-190.

MUND, M. D.; RIAZ, M.; MIRZA, M. A.; RAHMAN, Z. U.; MAHMOOD, T.; AHMAD, F., AMMAR, A. Effect of dietary tryptophan supplementation on growth performance, immune response and anti-oxidant status of broiler chickens from 7 to 21 days. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 1, p. 48-53, 2019.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33-60, 2005.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; HASHIMOTO, J. M.; MENEZES, H. C. D. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24-28, 2005.

PAN, X.; WEI, Z.; WANG, H.; YU, L.; LIANG, X. Effects of dietary tryptophan on protein metabolism and related gene expression in Yangzhou goslings under different feeding regimens. **Poultry Science**, v. 92, n. 12, p. 3196-3204, 2013.

PATIL, R. J.; TYAGI, J. S.; SIRAJUDEEN, M.; SINGH, R.; MOUDGAL, R. P.; MOHAN, J. Effect of dietary melatonin and L-tryptophan on growth performance and immune responses of broiler chicken under experimental aflatoxicosis. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 3, n. 1., p. 139-144, 2013.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 252-262, 2012.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 266-269, 1987.

POZZO, L.; SALAMANO, G.; MELLIA, E.; GENNERO, M. S.; DOGLIONE, L.; CAVALLARIN, L.; TARANTOLA, M.; FORNERIS, G.; SCHIAVONE, A. Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg). 1. Effects on growth and slaughter performance, haematological and serum traits. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 13-22, 2013.

QU, D.; HUANG, X.; HAN, J.; MAN, N. Efficacy of mixed adsorbent in ameliorating ochratoxicosis in broilers fed Ochratoxin A contaminated diets. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 4, p. 573-579, 2017.

RAHIMTULA, A. D.; BÉRÉZIAT, J. C.; BUSSACCHINI-GRIOT, V.; BARTSCH, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 23, p. 4469-4477, 1988.

RAO, T. P.; VARRA, M.; KUMAR, T. Effect of dietary ochratoxin on body weight and biochemical changes in broiler chicks. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 4, p. 947-950.

RUAN, D.; WANG, W. C.; LIN, C. X.; FOUAD, A. M.; CHEN, W.; XIA, W. G.; WANG, S.; LUO, X.; ZHANG, W. H.; YAN, S. J.; ZHENG, C. T.; YANG, L. Effects of curcumin on performance, antioxidation, intestinal barrier and mitochondrial function in ducks fed corn contaminated with ochratoxin A. **Animal**, v. 13, n. 1, p. 42, 2018.

SAKTHIVELAN, S. M.; RAO, G. V. S. Effect of ochratoxin A on body weight, feed intake and feed conversion in broiler chicken. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 2010.

SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; MAIORKA, P. C.; ALESSI, A. C.; KRABBE, E. L.; MAIORKA, A. The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers. **Avian Pathology**, v. 31, n. 1, p. 73-79, 2002.

SCRÖCKSNADEL, K.; WIRLEITNER, B.; WINKLER, C.; FUCHS, D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. **Clinica Chimica Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 82-90, 2006.

SHARMA, M.; MANDAL, A. B.; SINGH, R. Effect of Aflatoxin, ochratoxin and their interaction on growth performance, immunity and jejunal morphometry of broiler chickens. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 51, n. 3, p. 253-258, 2016.

SINGH, R.; MANDAL, A. B.; SHARMA, M.; BISWAS, A. Effect of varying levels of dietary ochratoxin A on the performance of broiler chickens. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 85, n. 3, p. 296-300, 2015.

ŚLIZEWSKA, K.; NOWAK, A.; SMULIKOWSKA, S. Probiotic preparation reduces faecal water genotoxicity and cytotoxicity in chickens fed ochratoxin A contaminated feed (in vivo study). **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 2, p. 281-286, 2016.

SLOMINSKI, A.; SEMAK, I.; PISARCHIK, A.; SWEATMAN, T.; SZCZESNIEWSKI, A.; WORTSMAN, J. Conversion of L-tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. **FEBS Letters**, v. 511, n. 1-3, p. 102-106, 2002.

SOLCAN, C.; PAVEL, G.; FLORISTEAN, V.; CHIRIAC, I.; ŞLENCU, B.; SOLCAN, G. Effect of Ochratoxin A on the intestinal mucosa and mucosa-associated lymphoid tissues in broiler chickens. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n.1, p. 30-48, 2005.

SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; ACQUAVIVA, R.; BARBAGALLO, I.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1742-1766, 2013.

- STOEV, S. D.; ANGUELOV, G.; IVANOV, I.; PAVLOV, D. Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 52, n. 1, p. 43-55, 2000.
- TAO, Y.; XIE, S.; XU, F.; LIU, A.; WANG, Y.; CHEN, D.; PAN, Y.; HUANG., L.; PENG., D.; WANG., X.; YUAN, Z. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 320-331, 2018.
- TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, n. 3, p. 171-176, 1996.
- TONG, C.; LI, P.; YU, L. H.; LI, L.; LI, K.; CHEN, Y.; YANG, S. H.; LONG, M. Selenium-rich yeast attenuates ochratoxin A-induced small intestinal injury in broiler chickens by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NF-KB activation. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 103784, 2020.
- TOSSOU, M. C. B.; LIU, H.; BAI, M.; CHEN, S.; CAI, Y.; DURAI PANDIYAN, V.; LIU, H.; ADEBOWALE, T. O.; AL-DHABI, N. A.; LONG, L.; TARIQUE, H.; OSO, A. O.; LIU, G.; YIN, Y. Effect of high dietary tryptophan on intestinal morphology and tight junction protein of weaned pig. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 75-92, 1998.
- VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, n. 4976, p. 1112-1113, 1965.
- VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4461-4464, 1996.
- WALBEEK, W. V.; SCOTT, P. M.; HARWIG, J.; LAWRENCE, J. W. *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 1281-1285, 1969.
- WANG, Q.; LIU, D.; SONG, P.; ZOU, M. H. Deregulated tryptophan-kynurenine pathway is linked to inflammation, oxidative stress, and immune activation pathway in cardiovascular diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 20, p. 1116, 2016.
- WANG, Y.; WANG, L.; LIU, F.; WANG, Q.; SELVARAJ, J. N.; XING, F.; YUEJU, Z.; LIU, Y. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 83, 2016.
- WEI, Z. Y.; WANG, L.; JI, Y.; YU, L. H.; PAN, X. H.; WANG, M. Z.; WANG, H. R. Effects of dietary tryptophan supplementation and feed restriction on growth performance and carcass characteristics of goslings. **Journal of Animal Veterinary Advances**, v. 10, n. 16, p. 2079-2083, 2011.

WU, B.; LI, L.; RUAN, T.; PENG, X. Effect of methionine deficiency on duodenal and jejunal IgA+ B cell count and immunoglobulin level of broilers. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 3, p. 165, 2018.

YANG, S.; LI, L.; YU, L.; SUN, L.; LI, K.; TONG, C.; XU, W.; CUI, G.; LONG, M.; LI, P. Selenium-enriched yeast reduces caecal pathological injuries and intervenes changes of the diversity of caecal microbiota caused by ochratoxin-A in broilers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 137, p. 111139, 2020.

YAO, K.; FANG, J.; YIN, Y. L.; FENG, Z. M.; TANG, Z. R.; WU, G. Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 286-297, 2011.

YU, Z.; WU, F.; TIAN, J.; GUO, X.; AN, R. Protective effects of compound ammonium glycyrrhizin, L-arginine, silymarin and glucuro lactone against liver damage induced by ochratoxin A in primary chicken hepatocytes. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 3, p. 2551-2560, 2018.

YUE, Y.; GUO, Y.; YANG, Y. Effects of dietary L-tryptophan supplementation on intestinal response to chronic unpredictable stress in broilers. **Amino Acids**, v. 49, n. 7, p. 1227-1236, 2017.

ANEXO 1 - CEUA



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 151/2017

Londrina, 18 de dezembro de 2017.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: **“Impacto de Exposição das Mitoxinas no Sistema Imunológico, na Microbiótica Intestinal e Sistema Nervoso Central em Aves.”** protocolo CEUA Nº **18289.2017.16** sob a responsabilidade de **Eiko Nakagawa Itano**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **11/12/2017**.

O objetivo é analisar os efeitos da exposição oral às micotoxinas no sistema imunológico sistêmico e local (mucosa intestinal), na microbiota intestinal e sistema nervoso central em aves e verificar se a dieta rica em triptofano neutraliza estes efeitos. Grau de invasividade=1

Vigência do Projeto	08/01/2018 a 08/01/2021
Espécie/linhagem	Ave (Cobb)
Nº de animais	280
Peso/Idade	1 dia / 42 gramas
Sexo	Machos
Origem	Globo Aves de Cascavel
Amostras a serem coletadas	Sangue, Órgãos linfóides

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


 Profa. Dra Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UEL

APÊNDICE – ARTIGO 1

Tryptophan attenuates the effects of OTA on intestinal morphology and local IgA/IgY production in broiler chicks

Fernando Galdino Ricci¹, Leticia Rodrigues Terkelli¹, Emerson José Venancio¹, Larissa Justino², Beatriz Queiroz dos Santos², Ana Angelita Sampaio Baptista², Alexandre Oba³, Bianca Dorana de Oliveira Souza¹, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense⁴, Elisa Yoko Hirooka⁵ and Eiko Nakagawa Itano¹

¹ Department of Pathological Sciences, State University of Londrina.

² Department of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina.

³ Department of Zootechny, State University Londrina.

⁴ Laboratory of Animal Pathology, State University of Londrina.

⁵ Department of Food Science and Technology, State University Londrina.

Artigo original publicado na revista *Toxins*, n. 13, v. 5, 2021.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* that can contaminate products of plant origin that are used as animal feed. Through oral exposure, this mycotoxin primarily affects the chicken gastrointestinal system. The present study evaluated the intestinal toxic effects of OTA and the introduction of L-tryptophan to alleviate these effects in chickens. One-day-old chicks were exposed to a single OTA dose (1.4 mg/kg body weight—b.w.) and treated with or without four daily doses of L-tryptophan (100 mg/kg b.w.). Duodenal villus height/crypt depth, fecal immunoglobulin A/immunoglobulin Y (IgA/IgY) levels, and duodenal positive immunoglobulin A cells (IgA+) were evaluated by histology, ELISA, and immunohistochemistry, respectively, on the 14th day. There were significant changes in the duodenal villus height, crypt depth, and levels of fecal IgA/IgY and duodenal IgA+ cells ($p < 0.05$) in groups exposed to OTA. On the other hand, groups exposed to OTA and treated with L-tryptophan showed similar levels of villus height, IgA/IgY levels, and duodenal IgA+ cells to those of the control group ($p > 0.05$). In conclusion, exposure to a single dose of OTA orally induces changes in intestinal morphology, levels of IgA/IgY antibodies, and IgA+ cells. Thus, treatment with L-tryptophan may be a valid alternative means to reduce the harmful effects of OTA on the intestinal mucosa, which requires further study.

Keywords: IgA; IgY; mycotoxins; villi; crypts

APÊNDICE – ARTIGO 2

Fungos ocratoxigênicos e aspectos moleculares da Ocratoxina A

Fernando Galdino Ricci¹, João Gabriel de Albuquerque Cavalcanti¹, Emerson José Venâncio¹, Ana Angelita Sampaio Baptista², Marielen de Souza², Bianca Dorana de Oliveira Souza¹, Franciele Semêncio Chiyoda-Rodini¹, Elisa Yoko Hirooka³, Mario Augusto Ono¹, Eiko Nakagawa Itano¹

¹ Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina.

³ Departamento de Ciências de Alimentos e Tecnologia, Universidade Estadual de Londrina.

Artigo de revisão submetido à revista *Biosaúde*.

Resumo

A Ocratoxina A (OTA) ou (*R*)-*N*-[(5-cloro-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1*H*-2-benzopiran-7-il)carbonil]-*L*-fenilalanina possui massa molecular de 403,81 g/mol, é produzida por pelo menos 22 espécies de *Aspergillus* e 2 de *Penicillium*, sendo *A. ochraceus* a primeira espécie produtora descrita. Estes fungos com os seus metabólitos, são contaminantes naturais de alimentos destinados ao consumo humano e rações para animais, o que pode levar a contaminação e causar prejuízos à saúde humana e animal. A OTA é uma toxina produzida como metabólito secundário, possivelmente envolvendo duas vias de biossíntese, pela via de dihidroisocumarina e *L*-β-fenilalanina. Uma vez ingerida, pode causar lesões principalmente em rins, fígado, tecidos ou órgãos do sistema imunológico, mucosas do trato intestinal e sistema nervoso central. A OTA pode causar tumores em rins de camundongos e ratos, sendo classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo 2B, como possivelmente carcinogênica para os humanos. Vários mecanismos da ação tóxica da OTA têm sido descritos na literatura, tais como; inibição de síntese de proteínas, indução de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). A OTA também pode induzir peroxidação lipídica da membrana, apoptose celular e aumento de mediadores inflamatórios. O melhor conhecimento de seus mecanismos tóxicos a nível molecular é importante para a criação de estratégias de prevenção e terapias após a intoxicação em humanos ou animais.

Palavras-chave: Imunotoxicidade, micotoxina, mucosa intestinal, toxicidade.