

AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, RETICULÓCITOS E MIELOGRAMA NA INTOXICAÇÃO SUBAGUDA EXPERIMENTAL POR AFLATOXINA EM CÃES

EXPERIMENTALLY INDUCED SUB-ACUTE AFLATOXICOSIS IN DOGS: EVALUATION OF HEMOGRAM, RETICULOCYTE AND MYELOGRAM

Rosana Lopes¹ Cândido Fontoura da Silva² Sonia Terezinha dos Anjos Lopes³
Luciana D'Ambrósio Guimarães⁴ Janio Morais Santúrio⁵
Carlos Augusto Mallmann⁶ João Francisco Coelho de Oliveira⁷

RESUMO

*As aflatoxinas estão entre os produtos metabólicos de natureza tóxica e são produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*. O presente trabalho tem como objetivo, verificar as possíveis alterações da aflatoxicose através da avaliação do hemograma, contagem de reticulócitos e mielograma em cães. Foram utilizados vinte cães (9 fêmeas e 11 machos), os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de dez animais. O grupo I recebeu 14g de aflatoxina/kg/dia e o grupo II 21g de aflatoxina/kg/dia, via oral, durante vinte dias. Após foram realizadas colheitas de sangue e medula óssea, a cada sete dias, durante seis semanas. Ambos os grupos apresentaram sinais clínicos de intoxicação por aflatoxina, o hemograma e a contagem de reticulócitos não demonstraram variações significativas. No mielograma, observou-se acentuada diminuição da série eritróide e do número de megacariócitos, aumento significativo da série mielóide e proporção mielóide: eritróide (M:E).*

Palavras-chave: hemograma, reticulócitos, mielograma, aflatoxicose, cães.

SUMMARY

*The aflatoxins are between the metabolics products nature of toxic and produced are by genus of fungi *Aspergillus*. The objective of the present study was to verify alterations of aflatoxicosis through of evaluation hemogram, reticulocyte count and myelogram in dogs. Eleven males and nine female dogs were used. Dogs were randomly allocated into two groups. Group I was treated with 14g/kg/day of aflatoxin and group II with 21g/kg/day. The drug was given miled with feed and treatment lasted for 20 days. After the beginning of intoxication, individual blood and bone marrow samples were taken weekly for six weeks. The two group to clinical signs present of intoxication by aflatoxin the hemogram and reticulocyte count not showed significative variation. The myelogram showed a total reduction in the erythroid series and number of megacaryocytes significative increase myeloid serie and myeloid: erythroid ratio (M:E).*

Key words: hemogram, reticulocyte, myelogram, aflatoxicosis, dogs.

¹Médico Veterinário, Msc, Professor, Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e-mail: Rosana@lince.hcv.ufsm.br. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário, Professor, DCPA, UFSM.

³Médico Veterinário, Professora, DCPA, UFSM.

⁴Médico Veterinário, aluna do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

⁵Médico Veterinário, Professor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), UFSM.

⁶Médico Veterinário, Professor, DMVP, UFSM.

⁷Médico Veterinário, Professor, Departamento de Clínica de Grandes Aanimais, UFSM.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são elaboradas quando certas cepas de *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus parasiticus* crescem em um substrato sob condições favoráveis para a formação da toxina (CLARK *et al.*, 1986, NIBBELINK, 1986, HARVEY *et al.*, 1991). O Brasil, devido a seu clima tropical propicia condições ideais para a proliferação dos fungos responsáveis pela produção das aflatoxinas (SABINO *et al.*, 1988). EDDS (1973), cita que as espécies de *Aspergillus flavus* crescem em temperaturas acima de 21,1°C e com teor de umidade de 10 a 40%. Estes microorganismos contaminam um grande número de produtos alimentícios, podendo-se citar, entre outros, as sementes oleaginosas, os cereais, as raízes e os tubérculos (SABINO, 1980).

Um grande surto da doença em cães, designado "Hepatite X", foi inicialmente relatado no sudeste dos Estados Unidos em 1952 (SEIBOLD & BAILEY, 1952). De acordo com EDDS (1973), OSUNA & EDDS (1982) e CLARK *et al.* (1986) a suscetibilidade à aflatoxina parece variar de acordo com as espécies, raça, sexo, idade, nutrição e estado de saúde.

NIBBELINK (1986) relata que os dados laboratoriais em casos de aflatoxicose freqüentemente devem refletir a toxicidade hepatocelular e mudanças secundárias nos parâmetros sanguíneos. Segundo NEWBERNE *et al.* (1955), uma contagem leucocitária normal e uma moderada leucocitose é uma descoberta comum em cães com aflatoxicose.

A medula óssea é o principal local da hemopoiese em animais adultos normais. A função primária da medula óssea é a produção e maturação de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas (SEYBOLD *et al.* 1980). Conforme BASTIANELLO *et al.* (1987), hiperplasia da medula óssea na diáfise femoral foi observada em cães intoxicados naturalmente por aflatoxina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados vinte cães, sem raça definida (9 fêmeas e 11 machos), clinicamente sadios, de peso e idade variados. Os animais passaram por um período de adaptação de vinte dias, para ambientação, sendo everminados com Drontal Plus (20mg/kg) em dose única e sofrendo eliminação de eventuais ectoparasitas, através da utilização de Amitraz, na diluição de 4ml em um litro de água para uso externo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, e numerados de um a dez, recebendo água *ad libitum* e

ração comercial acrescida de aflatoxina na dose de 14g e 21g/kg/dia respectivamente para os grupos 1 e 2 oferecida por um período de vinte dias.

A aflatoxina foi produzida em fermentação de arroz parboilizado, com *Aspergillus parasiticus* da linhagem NRRL 2999, no departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria por Santurio (1992) segundo técnica de SHOTWELL *et al.* (1966), modificada por WEST *et al.* (1973).

Foram realizadas três colheitas de 5ml de sangue, através de punção da veia cefálica e aspirações de medula óssea da crista ilíaca dos animais, no período de adaptação, a cada sete dias, para obtenção dos valores controles. Após o início do período de intoxicação, foram efetuadas seis colheitas de sangue e aspirações de medula óssea, a cada sete dias, sendo as três primeiras colheitas durante o período de intoxicação e as três últimas após a intoxicação. Dos 5ml de sangue colhidos com seringas e agulhas descartáveis, 2,5ml foram acondicionados em frascos de vidro contendo anticoagulante EDTA a 10% e destinados a avaliação do hemograma e contagem de reticulócitos. A determinação do volume globular foi realizada através da técnica (microhematócrito), segundo JAIN (1986). A determinação do número total de leucócitos foi efetuada em contador eletrônico Coulter Counter e a hemoglobina quantificada no hemoglobímetro de Coulter. Os esfregaços sanguíneos foram corados pelo método Panótico Rápido, sendo após realizada a contagem diferencial dos leucócitos através de microscopia óptica com imersão em óleo. Para determinação do número de reticulócitos utilizou-se 0,1ml de sangue que foi incubado a 37°C juntamente com 0,1ml do corante Azul de Cresil Brilhante durante vinte minutos. Posteriormente foram confeccionados esfregaços, e através de microscopia óptica determinou-se o percentual de reticulócitos em relação ao número de 1000 eritrócitos.

Logo após a colheita de sangue, foram efetuadas aspirações de medula óssea da crista ilíaca, para avaliação do mielograma. Os cães foram tranquilizados previamente com Citrato de Fentanila na dose de 0,5ml/10kg de peso vivo e Acepromazina a 1% na dose de 0,3ml para cada animal, por via intravenosa lenta. Após era feita a tricotomia e antissepsia da região da crista ilíaca; sendo então realizada a anestesia local, por infiltração entre o tecido subcutâneo e periosteio com 2 a 3ml de Cloridrato de Lidocaína. Com uma agulha de calibre 40 x 12 a pele foi perfurada e divulsionada, posteriormente foi introduzida uma agulha OSGOOD 30 x 12 através da crista ilíaca com movimentos

rotatórios. Após a retirada do mandril foi aspirada uma quantidade de 0,5ml de medula óssea com seringa descartável de 10ml. Os esfregaços em lâminas de vidro foram prontamente efetuados e corados com Leishmann, segundo HAYHOE & FLEMANS (1989). Procedeu-se a contagem de 500 células da medula óssea, através de microscopia óptica, sendo registrado através de percentagem o diferencial e a relação mielóide: eritróide de cada determinação.

A análise estatística foi realizada através de análise de variância e as diferenças entre médias comparadas por meio de contrastes utilizando-se o programa estatístico SAS (1985), conforme o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ijk}$$

onde: $i=1,2,\dots,I$; $j=1,2,\dots,J$; e $k=1,2,\dots,K$.

Y = variável resposta;

m = constante inerente a todas as observações;

a_i = a contribuição do i ésimo nível do fator semana;

b_j = a contribuição do j ésimo nível do fator dose;

$(ab)_{ij}$ = a interação da contribuição do i ésimo nível do fator semana e do j ésimo nível do fator dose;

e_{ijk} = erro;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados iniciaram de forma lenta nos animais do grupo I, formado por cinco machos e cinco fêmeas, a partir do 15º dia da intoxicação. Pôde ser verificada: depressão, anorexia, desidratação, emese, icterícia, hemorragia gengival e sangramento no local de venipunctura, hematoquesia, e urina de coloração amarelo-alaranjada em todos os animais desse grupo.

No grupo II, formado por 6 machos e 4 fêmeas, os sinais clínicos foram semelhantes aos do grupo I, sendo observados a partir do 10º dia da intoxicação. Apenas um dos animais desse grupo apresentou hematemese.

Os sinais clínicos de depressão, anorexia, icterícia e hematoquesia encontrados em ambos os grupos, corroboram com os achados de SEIBOLD & BAILEY, (1952), NEWBERNE *et al.* Autores como SEIBOLD & BAILEY (1952), HAGIWARA *et al.* (1990) e SCHMIDT (1994) relataram a presença de urina de coloração amarelo-alaranjada, hemorragia, hematemese e sangramento no local de venipunctura, sinais clínicos que também foram encontrados nesse experimento.

No hemograma, foram observadas respostas variadas para cada animal. A análise do eritrograma

ma no grupo I e II (Figura 1) revelou aumento moderado no número de eritrócitos, volume globular e hemoglobina durante e após o período de intoxicação. Esses resultados não foram encontrados por OSUNA & EDDS (1982), HARVEY *et al.* (1988) e HAGIWARA *et al.* (1990) que contrariamente verificaram redução nos valores do eritrograma. O aumento moderado dos parâmetros eritrocitários encontrados pode ser devido a hemoconcentração causada pelo estado de desidratação, em consequência da depleção de água do plasma pela emese e ingestão hídrica insuficiente.

No leucograma (Figura 2), oito animais pertencentes aos dois grupos apresentaram leucocitose por neutrofilia, confirmando esses achados, aqueles de NEWBERNE (1955), HARVEY *et al.* (1988) e HAGIWARA *et al.* (1990). RAGAB *et al.* (1987) citaram como provável causa de leucocitose no sangue periférico a resposta à anemia, produzindo hiperatividade da medula óssea; enquanto que TANDON *et al.* (1977), relataram como provável etiologia do fato, alguma infecção ou maciça necrose celular hepática. Um quadro leucocitário com leucopenia e neutropenia foi identificado em onze animais, tanto do grupo I como do II, podendo esse resultado ser atribuído ao seqüestro de polimorfonucleares no parênquima hepático devido a demanda tecidual exacerbada por necrose dos hepatócitos. Linfopenia foi observada em três animais do grupo I e II, como possível resposta à diminuição de mitose dos linfócitos, mencionada por NEWBERNE (1973), NIBBELINK (1986) e HARVEY *et al.* (1991). Parâmetros leucocitários próximos a média dos valores controle, foram observados em dois animais do grupo II, estando esse quadro de acordo com os relatos de NEWBERNE *et al.* (1955) e SCHMIDT (1994). Granulações tóxicas

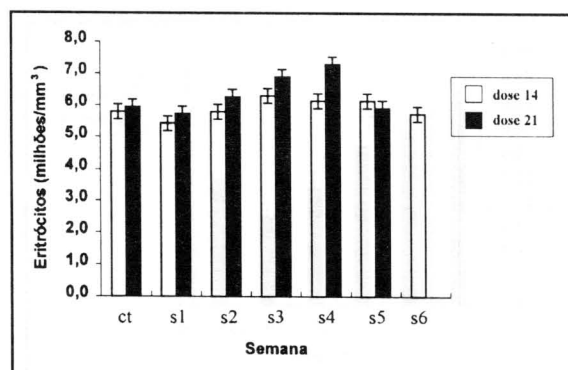


Figura 1 - Valores médios dos controles (ct), média do total de eritrócitos (milhões/mm³) do hemograma dos cães do grupo I (14µg) e II (21µg) e erro padrão da média.

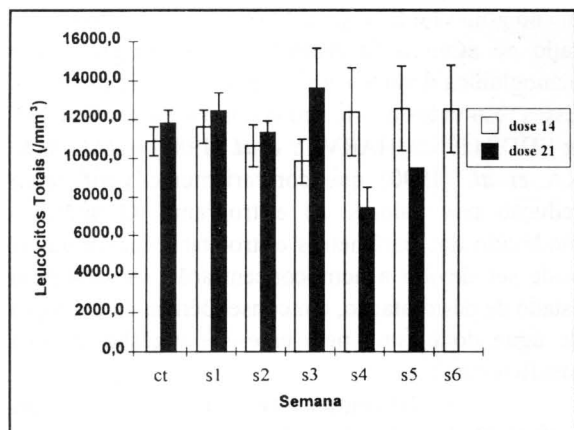


Figura 2 - Valores médios dos controles (ct), média dos leucócitos totais (/mm³) do hemograma dos cães do grupo I (14µg) e II (21µg) e erro padrão da média.

no citoplasma dos neutrófilos no sangue periférico foram identificadas em nove animais do grupo I e nove do II, estando essas alterações presentes em maior número nos animais durante o período de intoxicação. Segundo JAIN (1993), essa observação indica maturação prejudicada dessas células, confirmando dessa maneira as alterações nos sistemas hematopoiéticos e hematológicos pela ação da aflatoxina citados por HARVEY *et al.* (1988).

Na avaliação do mielograma, foi verificada acentuada redução no total da série eritróide (Figura 3) em ambos os grupos, durante e após o período de intoxicação. Esse resultado foi significativo na terceira e quarta semana ($p < 0,01$). Quanto ao percentual de células diferenciadas da série eritróide, pôde ser observada diminuição significativa dos eritroblastos basofílicos (Eb), eritroblastos policromáticos (Ep) e meta-eritrócitos (M-Er). Esse resultado, associado aos valores de reticulócitos próximo aos controles é

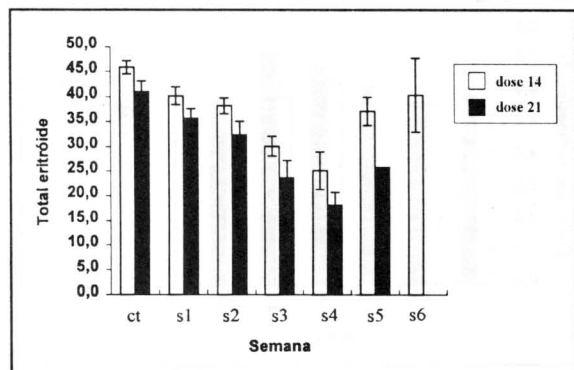


Figura 3 - Valores médios dos controles (ct), média do total de células da série eritróide (%) do mielograma dos cães do grupo I (14µg) e II (21µg) e erro padrão da média.

indicativo de uma eritropoiese ineficiente; possivelmente por mielotoxicidade e rápida perda de sangue via intestino. Na série mielóide do mielograma (Figura 4) verificou-se aumento significativo ($p < 0,01$) no total das células mielóides no grupo I e II, durante a terceira e quarta semana. O percentual de células diferenciadas da série mielóide, revelou neutrofilia em ambos os grupos, também durante a terceira e quarta semana, esse resultado foi significativo ($p < 0,01$). A elevação encontrada na série mielóide do mielograma, com aumento concomitante de neutrófilos, sustenta os achados de BASTIANELLO *et al.* (1987) que verificaram hiperplasia da medula óssea em cães intoxicados naturalmente por aflatoxina e CUKROVÁ *et al.* (1992a), CUKROVÁ *et al.* (1992b) que observaram aumento no número de colônias formadoras de granulócitos e macrófagos em ratos intoxicados por aflatoxina. Os resultados de HARVEY *et al.* (1988), divergem desse achado, pois verificaram diminuição na celularidade granulocítica da medula óssea em suínos intoxicados com aflatoxina na ração.

A contagem de megacariócitos no mielograma, demonstrou uma acentuada diminuição em todos os animais tanto no grupo I como no II, principalmente na terceira semana quando comparados com os controles. Através de microscopia óptica observou-se vacuolização citoplasmática dos megacariócitos e diminuição da granulação durante o período de intoxicação sugerindo ação tóxica da aflatoxina nessas células, conforme citaram RAGAB *et al.* (1987) e aumento no número de megacariócitos imaturos (megacarioblastos) após intoxicação.

Nas lâminas do mielograma, foram observados também através de microscopia óptica, células mielóides tóxicas, comprovando-se as mesmas alterações encontradas em neutrófilos no sangue periférico; aglomerados plaquetários pela destruição dos megaca-

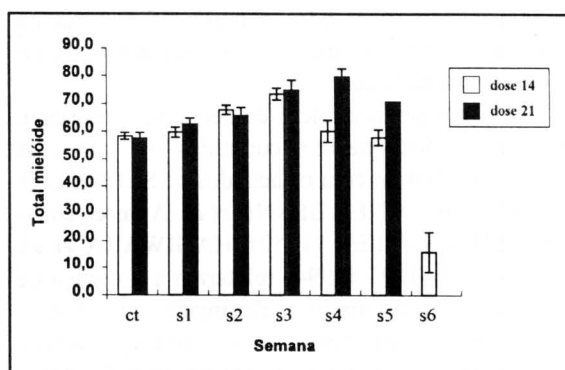


Figura 4 - Valores médios dos controles (ct), média do total de células da série mielóide (%) do mielograma dos cães do grupo I (14µg) e II (21µg) e erro padrão da média.

riócitos; vacúolos em algumas células eritróides e aumento no número de células degeneradas como provável consequência de mielotoxicidade da aflatoxina. Essas alterações foram mais severas no grupo II, isso pode ser explicado através dos relatos de RAGAB *et al.* (1987), BASTIANELLO *et al.* (1987) e CUKROVÁ *et al.* (1992a) que sugerem um provável efeito citotóxico da aflatoxina na medula óssea de animais após a observação de aberrações cromossômicas e hipocelularidade no mielograma durante aflatoxicose.

Houve elevação acentuada da proporção mielóide: eritróide, nos animais do grupo I e II, principalmente no final do experimento, sendo consequência da diminuição da série eritróide e aumento da série mielóide, confirmando relato de HARVEY (1984). Esse resultado foi significativo ($p < 0,01$) na terceira e quarta semana. Esse achado pode ser sustentado através da redução das células eritróides pela presença dos sinais clínicos de hematoquesia, sangramento gengival e no local de venipuntura, associados aos parâmetros leucocitários e contagem de reticulócitos do sangue periférico próximo aos valores controles.

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nesse experimento, pode-se concluir que:

- A resposta a aflatoxina no mielograma levou a mielotoxicidade nas séries eritrocítica, granulocítica e megacariocítica, representada por vacuolização citoplasmática e aumento do número de células degeneradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTIANELLO, S.S., NESBIT, J.W., WILLIAMS, M.C. *et al.* Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 4, p. 635-640, 1987.
- CLARK, J.D., GREENE, C.E., CALPIN, J.P. *et al.* Induced aflatoxicosis in rabbits: blood coagulation defects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 86, n. 3, p. 353-361, 1986.
- CUKROVÁ, V., KURITA, N., AKAO, M. Alterations in the growth and cycling status of granulocyte-monocyte colony-forming units (CFU-GM) in rats injected single doses of aflatoxin B. *Neoplasma*, v. 39, n. 2, p. 93-96, 1992a.
- CUKROVÁ, V., KURITA, N., AKAO, M. An early effect of aflatoxin B administered in vivo on the growth of bone marrow CFU-GM and the production of some cytokines in rats. *Mycopathologia*, v. 120, n. 2, p. 113-119, 1992b.
- EDDS, G.T. Acute aflatoxicosis: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 162, n. 4, p. 304-308, 1973.
- HAGIWARA, M.K., KOGIKA, M.M., MALUCELLI, B.E. Disseminated intravascular coagulation in dogs with aflatoxicosis. *Journal of Small Animal Practice*, v. 31, n. 5, p. 239-243, 1990.
- HARVEY, W.J. Canine bone marrow: normal hematopoiesis, biopsy techniques, and cell identification and evaluation. *Compendium Continuing Education Practicing Veterinarian*, v. 6, n. 10, p. 909-926, 1984.
- HARVEY, R.B., CLARK, D.E., HUFF, W.E. *et al.* Suppression of serum iron-binding capacity and bone marrow cellularity in pigs fed aflatoxin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 40, n. 4, p. 576-583, 1988.
- HARVEY, R.B., KUBENA, L.F., PHILLIPS, T.D. *et al.* Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *American Journal of Veterinary Research*, v. 52, n. 1, p. 152-156, 1991.
- HAYHOE, F.G.J., FLEMANS, R.J. *Citologia hematológica*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989, 240 p.
- JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p. Cap. 1, p. 1-19: Examination of the blood and bone marrow.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- NEWBERNE, P.M., BAILEY, W.S., SEIBOLD, H.R. Notes on recent outbreak and experimental reproduction of hepatitis x in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 127, p. 59-62, 1955.
- NEWBERNE, P.M. Chronic aflatoxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 163, n. 11, p. 1262-1267, 1973.
- NIBBELINK, S.K. Aflatoxicosis in food animals: a clinical review. *Iowa State University Veterinarian*, v. 48, n. 1, p. 28-31, 1986.
- OSUNA, O., EDDS, G.T. Toxicology of aflatoxin B, warfarin, and cadmium in young pigs: performance and hematology. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, n. 8, p. 1380-1386, 1982.
- RAGAB, A.M., SALEH, N.A., ELSHABINY, L.M. *et al.* Haematological parameters in chickens and rabbits after dietary administration of aflatoxin. *Assiut Veterinary Medical Journal*, v. 18, n. 35, p. 220-226, 1987.
- SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B1 em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 40, n. 2, p. 153-158, 1980.
- SABINO, M., LAMARDO, L.C.A., INOMATA, E.I. *et al.* Ocorrência de aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 48, n. 1-2, p. 81-85, 1988.

SAS USER'S. **Guide Statistics**: SAS. Cary, NC: Institute inc, 1985, 956 p. Cap. 20, p. 433-506: The GLM Procedure.

SCHMIDT, C. **Observações clínicas e hematológicas na aflatoxicose experimental em cães**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1994, 40 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica e Patologia Clínica). Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1994.

SEIBOLD, H.R., BAILEY, W.S. An epizootic of hepatites in the

dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 121, p. 201-206, 1952.

SEYBOLD, I.M., GOLDSTON, R.T., WILKES, R.D. The clinical pathology laboratory. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, p. 1517-1521, 1980.

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

Ciência Rural, v. 28, n. 2, 1998.